



# **Entwicklung neuartiger Aldolasevarianten für nicht hydroxylierte Donorsubstrate mittels gelenkter Evolution**

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation von  
Dipl.- Biochem. Sebastian Alexander Junker  
aus Kandel**

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Kolmar

Darmstadt 2018

---

Tag der Einreichung: 31. August 2018

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2018

Sebastian Alexander Junker: Entwicklung neuartiger Aldolasevarianten für nicht hydroxylierte Donorsubstrate mittels gelenkter Evolution

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2018

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2018

Veröffentlichung unter CC BY-NC-ND 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

---

## Erklärung

31.08.2018

Hiermit erkläre ich,

- dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt und verfasst habe, dass alle Hilfsmittel und sonstigen Hilfen angegeben und dass alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen habe, kenntlich gemacht worden sind;
- dass die Dissertation in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung noch nicht zu einem früheren Zeitpunkt an der Technischen Universität Darmstadt oder einer anderen in- oder ausländischen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.



---

Sebastian Junker

## Erklärung der Übereinstimmung

31.08.2018

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die Elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.



---

Sebastian Junker

---





## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits zuvor publiziert:

**Complete switch of reaction specificity of an aldolase by directed evolution in vitro. Synthesis of generic aliphatic aldol products.**

Junker, Sebastian; Roldan, Raquel; Joosten, Henk-Jan; Clapés, Pere; Fessner, Wolf-Dieter ». In: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, S. 10153-10157. DOI: 10.1002/anie.201804831.

**Minimalist Protein Engineering of an Aldolase Provokes Unprecedented Substrate Promiscuity.**

Güclü, Deniz; Szekrenyi, Anna; Garrabou, Xavier; Kickstein, Michael; Junker, Sebastian; Clapés, Pere; Fessner, Wolf-Dieter (2016): In: *ACS Catal.* 6 (3), S. 1848–1852. DOI: 10.1021/acscatal.5b02805.

Weitere Teile wurden als Patent eingereicht:

**Fructose-6-phosphate aldolase variants for aldol carboligations**

Consejo superior de investigaciones científicas, sustainable momentum.s.l, technical university of Darmstadt technology transfer office reserch department.  
*PCT/EP2018/058729*

Darüber hinaus kam es zu folgender Publikation:

**Donor promiscuity of a thermostable transketolase engineered by directed evolution - Efficient complementation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase activity.**

Saravanan, Thangavelu; Junker, Sebastian; Kickstein, Michael; Hein, Sascha; Link, Marie-Kristin; Ranglack, Jan; Witt, Samantha; Lorillière, Marion; Hecquet, Laurence; Fessner, Wolf-Dieter (2017): In: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 57, S. 5358–5362. DOI: 10.1002/anie.201701169



*„Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden;  
es ist nicht genug, zu wollen, man muss auch tun.“*

Johann Wolfgang von Goethe (Werk: Wilhelm Meisters Wanderjahre)

---



---

## Vorwort

---

Zum Anfang dieser Arbeit würde ich mich gerne bei allen bedanken, die zu ihrem erfolgreichen Gelingen beigetragen haben:

Bei Herrn Professor Dr. Wolf-Dieter Fessner für das interessante Thema, die fachliche Hilfestellung, die er mir, wann immer sie nötig war, zuteilwerden ließ sowie für den großen Freiraum bei der Bearbeitung meiner Aufgaben. Auch durch die von ihm organisierten, internationalen Kooperationen konnte ich neue Techniken erlernen und Erfahrungen sammeln.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Harald Kolmar für seine Tätigkeit als Mitberichterstatter, In diesem Zusammenhang danke ich der COST für die Finanzierung verschiedener wissenschaftlicher Auslandsaufenthalte sowie Professor Dr. Pere Clapés und Dr. Anna Szekrényi für die hervorragende Zusammenarbeit in Barcelona und Darmstadt.

Für die Aufnahmen der NMR-Spektren danke ich Frau K. Jung, Herrn K.-O. Runzheimer und Herrn Pd. Dr. Meusinger, für die Durchführung von MS- und GC-MS-Messungen Frau Christiane Rudolph und Frau Gül Sahinalp.

Hervorzuheben ist auch der Einsatz von Herrn Michael Kickstein, die „gute Seele des Biolabors“, von dessen Erfahrung ich sehr profitieren konnte. Auch danke ich Frau Serbet Pinar-Safi, Frau Bettina Harnischfeger und Herrn Hans-Michael Orfgen für ihre vielfältige Hilfe bei diesem Projekt.

Für ihre gute Zusammenarbeit, ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei Dr. Ning He, Dr. Dong Yi, Dr. Titu Devamani, Dr. Madhura Rale, Dr. Thomas Scheidt, Dr. Mark Schnellbecher, Dr. Deniz Güclü, Dr. Dirk Heyl, Dr. Saravanan Thangavelu, Dr. Eva Heilig, Herrn Fabian Acke, Frau Inés Fúster Fernández, Frau Yenchai Tai, Frau Marie Reif und Herrn Alexander Mertsch bedanken. Weiterer Dank geht an Frau Hannah Kittel für Ihre moralische Unterstützung in schweren Stunden.

Zum Schluss möchte ich noch besonders meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Onkel Hans-Dieter für ihre Unterstützung und ihren Ratschlägen danken.

---



---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>Vorwort</b>	<b>IX</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XVI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Historische und aktuelle Betrachtung des Einflusses der Chemie auf die Umwelt	1
1.2. Generelle Vor- und Nachteile der Weißen Biotechnologie	3
1.3. Enzyme in der Synthese	7
1.4. Aldolasen in der enzymatischen Synthese	9
1.5. Fructose-6-phosphat-Aldolase	14
1.6. Bekannte FSA-Varianten durch Protein- <i>Engineering</i>	17
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>3. Allgemeiner Teil</b>	<b>23</b>
3.1. Theoretische Überlegungen zum rationalen FSA-Design	23
3.2. FSA-Assay-Entwicklung	27
3.2.1. Inhibition der FSA durch Aldehyde und Ketone	28
3.2.2. Präparative Reaktion von FSA D6E mit Aceton und verschiedenen Aldehyden	30
3.2.3. Synthese des Assaysubstrates 4-Hydroxyhexan-2-on	31
3.2.4. Alkohol-Dehydrogenase-Assay	33
3.2.5. Jod-Assay	35
3.2.6. Nitrotetrazoliumblausäurechlorid-Assay	36
3.2.7. Eliminierung von Aldehydspuren in 4-Hydroxyhexan-2-on	39
3.2.8. Resazurin-Assay	42
3.2.9. Kombiniertes Resazurinassay	44
3.2.10. Einfluss von DTT auf die FSA-Aktivität	45
3.2.11. Phenolrot-Assay	48
3.2.12. Sorbitol-Dehydrogenase-Assay	50

---

3.2.13.	Borsäureazofarbstoff-Assay	51
3.2.14.	Dünnschichtchromatographisches Screening	53
3.3.	FSA-Bibliothek Redesign	54
3.4.	Screening der FSA-Bibliothek D6X/T26X	60
3.5.	Gaschromatographische Untersuchungen ausgewählter FSA-Varianten	71
3.6.	Synthese	76
3.7.	Vergrößerung des aktiven Zentrums der FSA	85
3.8.	Erhöhung der Katalysegeschwindigkeit von FSA wt	90
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>92</b>
<b>5.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>98</b>
5.1.	Geräte und Reagenzien	98
5.1.1.	Analytik	98
5.1.2.	Lösungen und Puffer	99
5.1.3.	Genetik und <i>Thermal Shift Assay</i>	101
5.1.4.	Screening	102
5.1.5.	Synthese	104
5.1.6.	Zellkultur und Enzymherstellung	104
5.1.7.	Zellkultur-Medien und Zellen	105
5.2.	Kinetikmessungen mittels D-Fructose-6-phosphat-Assay	107
5.2.1.	Allgemeine Arbeitsvorschriften	107
5.2.2.	Einfluss von verschiedenen Aldehyden und Ketonen auf die FSA-Aktivität	110
5.2.3.	Einfluss von DTT auf die FSA-Aktivität	111
5.2.4.	Einfluss von Lysinen in der Nähe des katalytischen Eingangs auf die FSA-Aktivität	112
5.3.	Thermostabilität verschiedener FSA-Varianten	113
5.3.1.	<i>Thermal-Shift-Assay</i> verschiedener FSA-Varianten	113
5.4.	Erstellung von FSA-Mutanten und FSA-Bibliotheken	115
5.4.1.	Allgemeine Arbeitsvorschriften	115
5.4.2.	Herstellung von FSA L107A/L163A	119

---



5.4.3.	Herstellung von FSA K168S	119
5.4.4.	Herstellung von FSA K206S	119
5.4.5.	Herstellung von FSA A165G/T185A	119
5.4.6.	Vorhersage von möglichen positiven FSA-Varianten mittels <i>3DM</i> von <i>Bio-product</i>	120
5.4.7.	Herstellung von FSA D6A/T26I	121
5.4.8.	Erstellung der FSA-Bibliotheken D6L/N28X	121
5.4.9.	Erstellung der FSA-Bibliotheken D6E/N28X	122
5.4.10.	Erstellung der FSA-Bibliotheken D6H/N28X	123
5.4.11.	Erstellung der FSA-Bibliotheken D6X/T26X	124
5.5.	Entwicklung eines kolorimetrischen Hochdurchsatz- <i>Screenings</i>	126
5.5.1.	Allgemeine Arbeitsanweisungen	126
5.5.2.	Alkohol-Dehydrogenase-Assay	128
5.5.3.	Sorbitol-Dehydrogenase-Assay	128
5.5.4.	Jod-Assay	128
5.5.5.	Vortests zum Resazurin-Assay	128
5.5.6.	Resazurin-Assay	129
5.5.7.	Einfluss von DTT auf Resazurin	130
5.5.8.	Nitroblautetrazoliumchlorid-Assay	131
5.5.9.	Eliminierung von Aldehydspuren in 4-Hydroxyhexan-2-on	132
	Quenchen von Aldehydspuren mit Aldehyd-Dehydrogenase	132
5.5.10.	Kombiniertes Resazurinassay	134
5.5.11.	Phenolrot-Assay	136
5.5.12.	Borsäureazofarbstoff-Assay	138
5.5.13.	Dünnschichtchromatographisches- <i>Screening</i> der <i>3DM</i> -Mutante D6A/T26I	139
5.6.	Screening von FSA-Bibliotheken	140
5.6.1.	Allgemeine Arbeitsanweisungen	140
5.6.2.	Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA D6L/N28X-Bibliothek	143
5.6.3.	Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA D6H/N28X-Bibliothek	144
5.6.4.	Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA D6E/N28X-Bibliothek	145
5.6.5.	Dünnschichtchromatographisches Screening und Rescreening der FSA D6X/T26X Bibliothek mit Aceton und Propanal	146

---

5.6.6.	Sequenzierung der <i>Rescreening-Library</i> und Erstellung einer <i>Hit-Library</i>	150
5.6.7.	Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs- <i>Screening</i> der FSA D6X/T26X <i>Hit-Library</i> mit Aceton und Propanal.	152
5.6.8.	Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs- <i>Screening</i> der FSA D6X/T26X <i>Hit-Library</i> und DERA F200I mit Propanal	154
5.6.9.	Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs- <i>Screening</i> der FSA D6X/T26X der <i>Hit-Library</i> mit Aceton und Isovaleraldehyd	155
5.6.10.	Dünnschichtchromatographisches <i>Screening</i> der FSA D6X/T26X <i>Rescreening-Library</i> mit Acetaldehyd	157
5.6.11.	Dünnschichtchromatographisches <i>Screening</i> der FSA D6X/T26X <i>Hit-Library</i> mit Butanal	158
5.6.12.	<i>Screening</i> der <i>Hit-Library</i> mit Butanon und 3-Hydroxybutanal	159
5.6.13.	<i>Screening</i> der <i>Hit-Library</i> mit 3-Pentanon und 3-Hydroxybutanal	159
5.6.14.	<i>Screening</i> der <i>Hit-Library</i> mit Cyclohexanon und 3-Hydroxybutanal	159
5.6.15.	<i>Screening</i> der <i>Hit-Library</i> mit Cyclopentanon und 3-Hydroxybutanal	159
5.6.16.	Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs- <i>Screening</i> von Cyclopentanon mit (S)-3-Hydroxypentanon	160
5.7.	Enzymatische und Chemische Synthesen	163
5.7.1.	Allgemeine Arbeitsanweisungen	163
5.7.2.	Synthese von (5S,6R)-5,6,8-Trihydroxyoctan-4-on mittels FSA L163A	165
5.7.3.	Synthese von (4R)-4-Hydroxyhexan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen	167
5.7.4.	Synthese von (4R)-4-Hydroxyheptan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen	168
5.7.5.	Synthese von (4R)-4-Hydroxyoctan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen	169
5.7.6.	Synthese von (4R)-4-Hydroxy-6-methylheptan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen	170
5.7.7.	Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels Natriumhydroxid	171
5.7.8.	Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels LDA	172
5.7.9.	Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels Gasstromeinleitung von Propanal in Aceton	173
5.7.10.	Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels L-Prolin-Katalyse	175
5.7.11.	Synthese von (2R,3R)-2-Methylpentan-1,3-diol mittels FSA D6A/T26I	176
5.7.12.	Synthese von 2-Methylpentan-1,3-diol mittels FSA D6A/T26L	177

---

5.7.13.	Synthese von (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan	178
5.7.14.	Synthese von (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan	179
5.7.15.	Synthese von (4 <i>R</i> )-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan	180
5.7.16.	Synthese von (4 <i>R</i> )-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan	182
5.7.17.	Synthese von 2-Methylpent-2-en-1-ol	184
5.7.18.	Synthese von 2-Ethyl-2-hexenol	185
5.7.19.	Synthese von ( <i>E</i> )-(1-Methoxy-1-methylethoxy)-2-methyl-pent-2-en	186
5.7.20.	Synthese von ( <i>E</i> )-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-ethyl-hex-2-en	187
5.7.21.	Synthese von (4 <i>R</i> )-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on in MTBE	188
5.7.22.	Synthese von, 1,5,6-Trideoxy-3- <i>C</i> -methyl-3,4- <i>O</i> -(1-methylethyliden)- D- <i>threo</i> -2-hexulose	190
5.7.23.	Synthese von 4,4-Dimethoxybutan-2-ol	191
5.7.24.	Synthese von ( <i>S</i> )-4,4-Dimethoxybutan-2-ol mittels <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	192
5.7.25.	Synthese von ( <i>S</i> )-3-Hydroxybutanal mittels HCl	193
5.7.26.	Herstellung von ( <i>S</i> )-3-Hydroxybutanal mittels heißem Wasser	193
5.7.27.	Darstellung von 3,5-Dihydroxy-2,4-dimethylheptanal mittels FSA D6A/T26L	193
5.7.28.	Synthese von Sitophilure mittels FSA-Varianten aus 3-Pentanon und Propanal	194
5.8.	Gaschromatographische Analyse	195
5.8.1.	Allgemeine Arbeitsanweisungen	195
5.8.2.	Enantioselektivität von durch FSA D6E hergestelltem 4-Hydroxyhexan-2-on	196
5.8.3.	GC-MS-Analyse (EI) von (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan	198
5.8.4.	GC-MS-Analyse (EI) von (4 <i>R</i> )-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan	199
5.8.5.	GC-Analyse (EI) von (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-5-Ethyl-2,2- dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan	201
5.8.6.	GC-MS-Analyse (EI) von (4 <i>R</i> )-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan	202
5.8.7.	Quantitative GC-Analyse der Spezifität der selektivsten FSA D6X/T26X- Varianten für Aceton und Propanal	204
5.8.8.	Relative Synthesegeschwindigkeit von FSA D6A/T26L mit Propanal gegenüber Butanal	206
5.8.9.	Enantiomerenreinheit von ( <i>S</i> )-4,4-Diemthoxybutan-2-ol	207
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>208</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>211</b>

---

---

**Abkürzungsverzeichnis**


---

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
a	axial
2 x PBS	doppelkonzentrierter PBS-Puffer
AAV.	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AI-Medium	Autoinduktions-Medium
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq	Äquivalente
ber.	berechnet
brs	breites Signal
CAST	<i>combinatorial active-site saturation test</i> , zu Deutsch: "Kombinatorischer Sättigungstest des aktives Zentrum"
Cbz	Benzyloxycarbonyl-Gruppe
COST	<i>Coopération européenne dans le domaine de la recherche scientifique et technique</i>
Cy	Cyclohexan
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
de	<i>diastereomeric excess</i> , zu Deutsch: "Diastereomerenüberschuss"
DEE	Diethylether
DERA	2-Deoxy-D-ribose-5-phosphat-Aldolase
DHA	Dihydroxyaceton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DpnI	<i>Diplococcus pneumoniae</i> Nuklease 1
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	<i>enantiomeric excess</i> zu Deutsch: "Enantiomerenüberschuss"
eq	equatorial zu Deutsch: "äquatorial"
EtOAc	Ethylacetat
FSA	Fructose-6-phosphat-Aldolase
GC	Gaschromatographie
GlyGly	Glycylglycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , zu Deutsch: „Hochleistungsflüssigkeitschromatographie“
HPTLC	<i>high-performance thin-layer chromatography</i> , zu Deutsch: "Hochleistungsdünnschichtchromatographie"
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K <sub>m</sub> -Wert	Michaelis-Menten-Konstante
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium, zu Deutsch: „lysogene Brühe Medium“
LDA	Lithiumdiisopropylamid
MeOH	Methanol
MTBE	Methyl-tert-butylether

---

MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> , zu Deutsch: "Molekulare Ausschlussgröße"
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMR	nuclear magnetic resonance, zu Deutsch: „Kernspinresonanz“
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i> , zu Deutsch: „Nitrilotriessigsäure“
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , zu Deutsch: „phosphatgepufferte Salzlösung“ (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat, pH 7,4)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , zu Deutsch: „Polymerase-Kettenreaktion“
pH	Wasserstoffionenexponenten
pKs	Säurekonstante
ppm	<i>parts per million</i> , zu Deutsch: „Teile von einer Million“
Rf	Retentionsfaktor
rpm	<i>revolutions per minute</i> , zu Deutsch: „Umdrehungen pro Minute“
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	<i>retention time</i> zu Deutsch: „Retentionszeit“
S.	Seite
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , zu Deutsch: „Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese“
SOB-Medium	<i>Super Optimal Broth Medium</i> , zu Deutsch: „Super optimale Brühe Medium“
t	Triplet
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TB-Medium	<i>Terrific Broth Medium</i> zu Deutsch: „schreckliche Brühe“ Medium
TEA	Triethanolamin
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i> , zu Deutsch: "Schmelzpunkt"
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
δ	Sigma

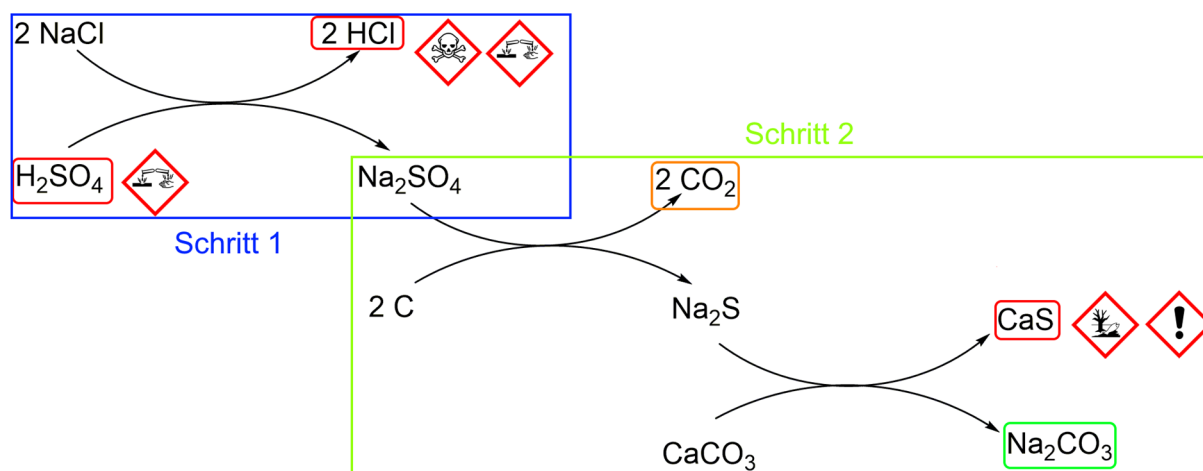
Aminosäuren und Nukleinsäuren wurden wie in Standardwerken der Biochemie abgekürzt<sup>[1]</sup>, Gene wurden klein und kursive geschrieben (z. B. *fsa*), die dazugehörigen Proteine groß und normal (z. B. FSA).



# 1. Einleitung

## 1.1. Historische und aktuelle Betrachtung des Einflusses der Chemie auf die Umwelt

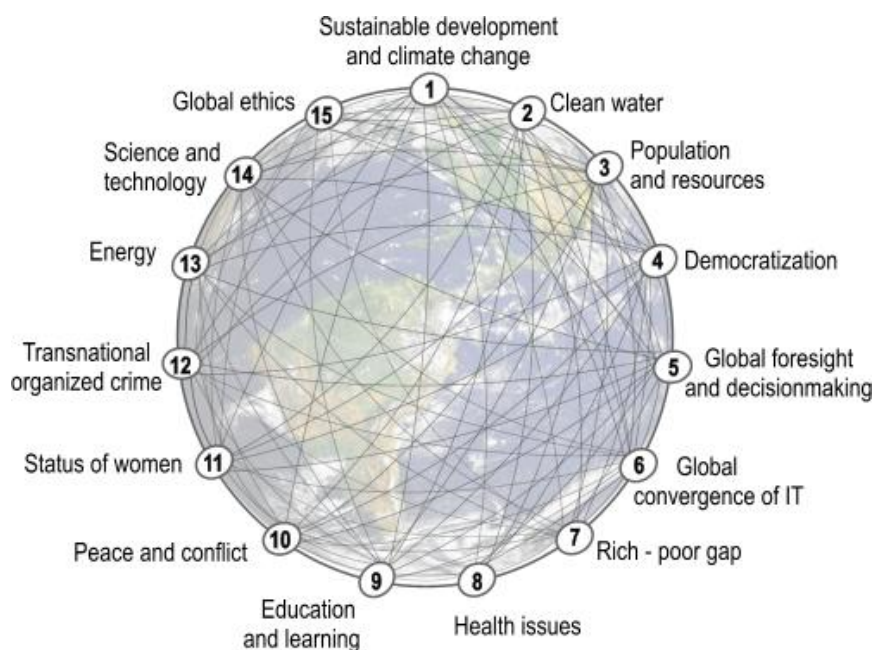
Seit Beginn der industriellen Nutzung der Chemie - ab dem Ende des 18. Jahrhunderts - steht diese im Konflikt mit dem Schutz der Umwelt. Damals wurde vor allem Schwefelsäure für die Soda(Natriumcarbonat)-Herstellung benötigt, welches wiederum zur Herstellung von Gläsern<sup>[2]</sup> und Seife sowie für die Reinigung von Baumwolle aus den englischen Kolonien benötigt wurde<sup>[2]</sup>. Die bis dahin übliche Gewinnung aus Pflanzenasche war unökonomisch<sup>[2]</sup>. So wurde im Jahre 1790 die erste Sodafabrik in Frankreich (Saint-Denis) mit einer Tagesproduktion von ca. 300 kg Soda in Betrieb genommen<sup>[2]</sup>. Die dafür benötigte Schwefelsäure wurde mithilfe des *Bleikammerverfahrens* durch die Verbrennung von Schwefel mit Salpeter (Nitratsalze) und anschließendem Einleiten in Wasser erzeugt<sup>[3]</sup>. Zur Herstellung von Soda wurde das *Leblanc-Verfahren* von *Nicolas Leblanc* verwendet<sup>[4]</sup>. Es basiert auf der Vermischung von Natriumchlorid mit heißer Schwefelsäure, wobei giftiger und ätzender Chlorwasserstoff entsteht. Das dabei zurückbleibende Natriumsulfat wurde mit Kalk und Kohle gebrannt, wodurch neben dem gewünschten Soda umweltschädliches Calciumsulfid und Kohlendioxid entstand (Abb. 1.)<sup>[4]</sup>. Das in die Umwelt entsorgte Calciumsulfid reagiert im Laufe der Zeit mit Kohlendioxid und Wasser aus der Luft zu Calciumcarbonat und giftigem Schwefelwasserstoff.



**Abb. 1.** *Leblanc-Verfahren* zur Darstellung von Soda ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Da diese Giftstoffe in stöchiometrischen Mengen bei der Sodaherstellung anfallen, war dieses Verfahren sehr umweltschädlich. Die weltweite Jahresproduktion im Jahre 1878 betrug jedoch nur ca. 624 Tonnen<sup>[2]</sup>, so dass die globale Auswirkung auf die Umwelt vernachlässigbar war. Im Laufe der Zeit wuchs jedoch der Bedarf an Soda, wodurch die weltweite Produktion im Jahre 1990 auf ca.  $32,3 \cdot 10^6$  Tonnen anstieg<sup>[2]</sup>. Wäre das *Leblanc-Verfahren* nicht durch wesentlich umweltfreundlichere Produktionsmethoden ersetzt worden, hätte es gewaltige Umweltschäden gegeben! Dieses Beispiel zeigt, dass die von der Chemie ausgehende globale Umweltgefahr nicht nur von der Umweltverträglichkeit des Herstellungsverfahrens an sich, sondern auch von der produzierten Menge abhängig ist. Mittlerweile ist der Bedarf an Chemikalien stark gestiegen und so wurden im Jahre 2013 laut der *European Chemicals Agency* von Industrieunternehmen ca. 30.000 verschiedene Chemikalien für den Gebrauch in der EU registriert<sup>[5]</sup>, welche bei ihrer Herstellung und Entsorgung die Umwelt belasten.

Da die *UN* davon ausgeht, dass sich die Weltbevölkerung von zur Zeit 7,5 Milliarden Menschen auf ca. 9,7 Milliarden im Jahre 2050 erhöht haben wird<sup>[6]</sup> und mit diesem Bevölkerungswachstum und dem steigenden Lebensstandard auch die chemische Produktion wächst, wird die Umweltbelastung weiter zunehmen. So schätzt die *OECD*, dass sich die industrielle Produktion von Chemikalien im Jahre 2020 um 85 % gegenüber der Produktion von 1995 steigern wird<sup>[7]</sup>. Allein in Deutschland war laut Statistischem Bundesamt die Chemie-, und Pharmaindustrie im Jahre 2013 für ca. 11 % des Gesamtabwassers, für 10 % des gesamten Primärenergiebedarfs, für 3 % der Kohlendioxid-Emissionen und 8 % der gefährlichen Abfälle verantwortlich<sup>[8]</sup>. Mit dem stark zu erwartenden Anstieg in der Chemieproduktion werden diese Werte weiter anwachsen. Dies ist insbesondere deswegen kritisch, da das internationale *Millennium*-Projekt, das die zukünftigen Herausforderungen der Menschheit untersucht, als wichtigste Punkte für die Zukunft den Klimawandel und die Versorgung mit sauberem Trinkwasser nennt (Abb. 2.)<sup>[9]</sup>.



**Abb. 2.** Die größten Herausforderungen der Menschheit<sup>[9]</sup>

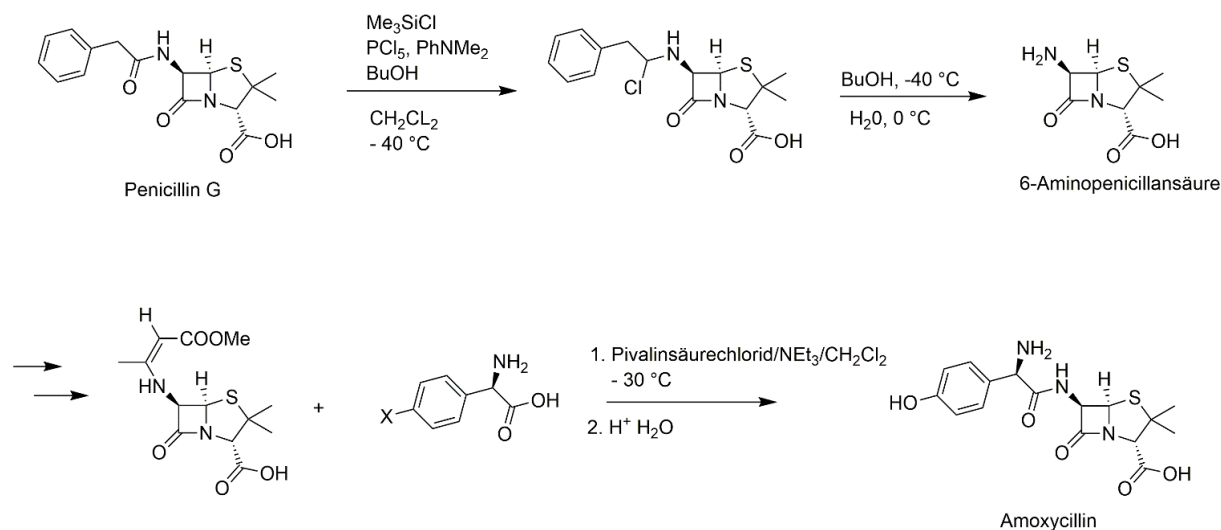
Will die Menschheit also die Herausforderungen dieses Jahrhunderts meistern, ist es unabdingbar, neue Verfahren zu entwickeln, um chemische Produkte auch bei steigender Produktionsmenge umweltfreundlicher, ressourcenschonender und energieeffizienter herzustellen. Nicht nur das reine Herstellen von wichtigen Verbindungen, sondern auch der Weg hierzu rückt in den Mittelpunkt. Damit sich die Chemie zu einer solchen umweltfreundlichen Grünen Chemie wandelt, wurden folgende Anforderungen für zukünftige Verfahren definiert. So sollen neue chemische Produkte sowie deren Abbauprodukte ungefährlich für Mensch und Umwelt sein. Bei ihrer Herstellung sollen giftige, umweltgefährdende oder unfallverursachende Substanzen vermieden werden. Die Chemikalien sollen aus erneuerbaren Quellen stammen und energieeffizient, mit hoher Atomökonomie („prozentualer Anteil der in einer chemischen Reaktion von den Edukten in die Produkte überführten Atome“)<sup>[10]</sup> umgesetzt werden. Dafür sind katalytische Reaktionen der Verwendung von Chemikalien, die in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden, zu bevorzugen<sup>[11]</sup>. Eine Möglichkeit, diese grünen Kriterien zu erreichen, bietet die „Weiße“ oder „Industrielle Biotechnologie“.



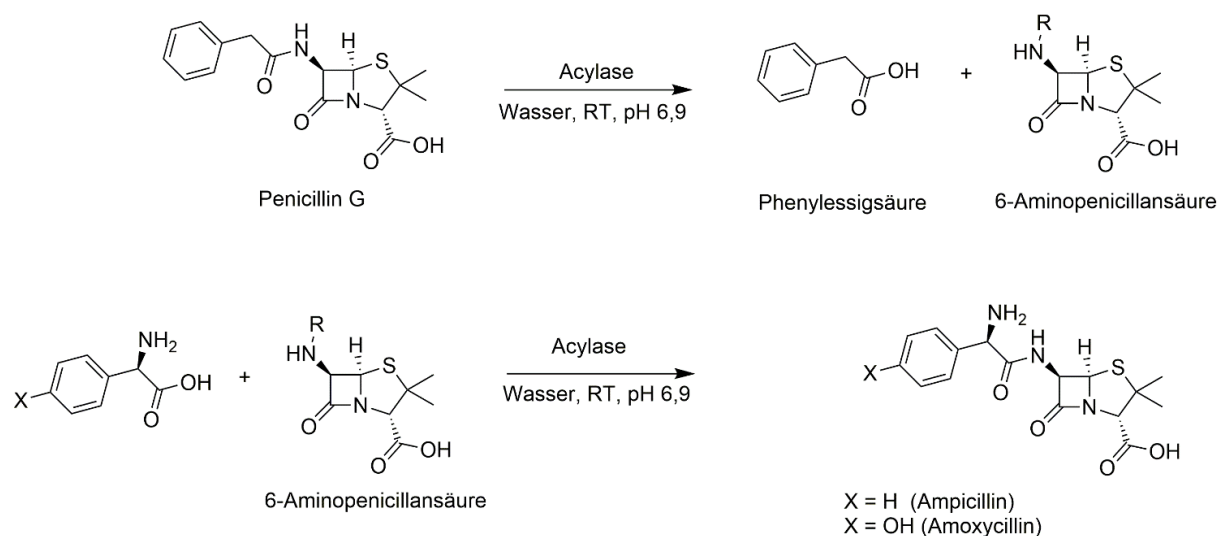
## 1.2. Generelle Vor- und Nachteile der Weißen Biotechnologie

Ziel der Weißen Biotechnologie ist es, chemische Produkte mithilfe von biologischen Katalysatoren wie Enzymen oder Mikroorganismen herzustellen<sup>[12]</sup>. Bei Enzymen handelt es sich um katalytische Proteine, welche wichtige Reaktionen in Lebewesen beschleunigen oder ermöglichen. Bisher werden ca. 80 % aller chemischen Prozesse mithilfe von Katalysatoren durchgeführt<sup>[13]</sup>. Im Gegensatz zu den dabei oft verwendeten Übergangsmetallkatalysatoren<sup>[14,14–16,16]</sup> aus sehr teuren, nicht immer ungefährlichen<sup>[17,18,18]</sup> und teilweise nur begrenzt verfügbaren Schwermetalle<sup>[19]</sup>, wie Ruthenium, Palladium oder Osmium, können Enzyme preiswert in - für industrietechnische Maßstäbe - nahezu unbegrenzter Mengen mithilfe von Bakterien hergestellt werden. Als natürliches Produkt sind sie 100 % biologisch abbaubar und in der Regel ungefährlich für die Umwelt. Während viele chemische Verfahren meist giftige und umweltschädliche organische Lösungsmittel benötigen<sup>[20][21]</sup>, arbeiten die meisten Enzyme als Bestandteil des Lebens optimal in ungefährlichen wässrigen Salzlösungen (Puffer). Trotzdem sind eine große Anzahl von Enzymen auch in organischen Lösungsmitteln aktiv<sup>[22]</sup>. Der Katalysemechanismus von Enzymen wurde im Laufe der Evolution über Millionen von Jahren optimiert, so dass die Katalysegeschwindigkeit denen der Übergangsmetallkatalysatoren enorm überlegen ist. Die Wechselzahl (die Anzahl an umgesetzten Molekülen pro katalytischem Zentrum) von Enzymen kann dabei über  $100000\text{ s}^{-1}$  betragen, während normale chemische Katalysatoren gewöhnlich nur eine Wechselzahl zwischen  $0,01\text{ s}^{-1}$  und  $1\text{ s}^{-1}$  erreichen<sup>[23]</sup>. Da viele Lebewesen bei natürlichen Temperaturen von  $-1\text{ °C}$  bis  $40\text{ °C}$  leben, sind ihre Enzyme daraufhin optimiert und arbeiten bei diesen milden Temperaturen optimal. Metallkatalysatoren brauchen hingegen oft hohe Temperaturen und Drücke, um effizient arbeiten zu können, was den Energieverbrauch und die Umweltbelastung erhöht. So findet die mittels Silberkatalysator vermittelte und im Multimegatonnen-Maßstab durchgeführte Reaktion von Ethylen zu Ethylenoxid bei  $200 - 300\text{ °C}$  und  $1 - 3\text{ MPa}$  statt<sup>[24]</sup>. Ein Teil des Ethylens wird dabei zu  $\text{CO}_2$  gespalten, was die Ausbeute und Umweltbilanz verschlechtert. Da es sich Lebewesen nicht leisten können, dass durch Nebenreaktionen wichtige Metaboliten zerstört oder Giftstoffe produziert werden, sind Enzyme enorm chemo-, und regioselektiv<sup>[22]</sup>. Die dadurch erreichte nahezu völlige Abwesenheit von Nebenprodukten erleichtert die Aufreinigung und ermöglicht sehr hohe Ausbeuten. Auch ist keinerlei Schutzgruppenchemie nötig, was die Stoff- und Umweltbilanz weiter verbessert. Diese Regio-, und Chemo-selektivität wird dadurch erreicht, dass nur ganz bestimmte Molekülstrukturen im aktiven Zentrum des Enzyms binden können und dort den lokalen chemischen Bedingungen ausgesetzt sind. Dadurch sind die Reaktionsbedingungen außerhalb des Enzyms sehr milde, so dass enzymkatalysierte Reaktionen in der Regel deutlich weniger ungewünschte Produktveränderung wie Isomerisierung, Racemisierung, Umlagerung oder Zersetzung aufweisen. So ist es möglich, mit ihnen selektiv auch eher instabilere Strukturen herzustellen und dabei die Reaktivität anderer funktioneller Gruppen im Molekül zu ignorieren. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Herstellung von Penicillin-Derivaten (Antibiotika). Dazu wird die sekundäre Carbonsäureamidbindung von Penicillin G/V gespalten und es entsteht 6-Aminopenicillansäure, welche danach zur Synthese verschiedener Penicillin-Derivate verwendet wird<sup>[22,25]</sup>. Da der für die antibiotische Wirkung verantwortliche  $\beta$ -Lactamring hydrolyselabiler ist als die Carbonsäureamidbindung, gibt es keinen chemischen Weg, Penicillin G/V direkt in 6-Aminopenicillansäure umzuwandeln. So muss die Ketogruppe des sekundären Carbonsäureamides erst in ein Ketiminchlorid umgewandelt werden, ohne dabei die tertiäre Carbonsäureamidbindung zu verändern<sup>[25]</sup>. Erst dann ist es möglich, das so entstandene Ketiminchlorid chemisch selektiv zu hydrolysieren, wobei Temperaturen von  $-40\text{ °C}$  nötig sind, um den empfindlichen  $\beta$ -Lactamring zu schützen<sup>[25]</sup>.

Bei der darauffolgenden Derivatisierung sind ebenfalls niedrige Temperaturen von  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  [26], organische Lösungsmittel und Schutzgruppenchemie nötig (Abb. 3.). Die Enzyme der Penicillin-Acylase-Gruppe können hingegen - aufgrund ihrer Selektivität - sowohl die Spaltungs- als auch die Derivatisierungsreaktion bei Raumtemperatur durchführen und benötigen nur Wasser als Lösungsmittel (Abb. 4.) [22][27]. So wurden 1999 ca. 10.000 Tonnen 6-Aminopenicillinsäure auf biotechnologischem Weg hergestellt [28] und zu verschiedenen Penicillin-Derivaten umgesetzt.



**Abb. 3.** Chemische Spaltung von Penicillin zu 6-Aminopenicillansäure mittels des *Delft Cleavage*-Verfahrens [25] und anschließender Weiterverarbeitung zu Amoxycillin [26]

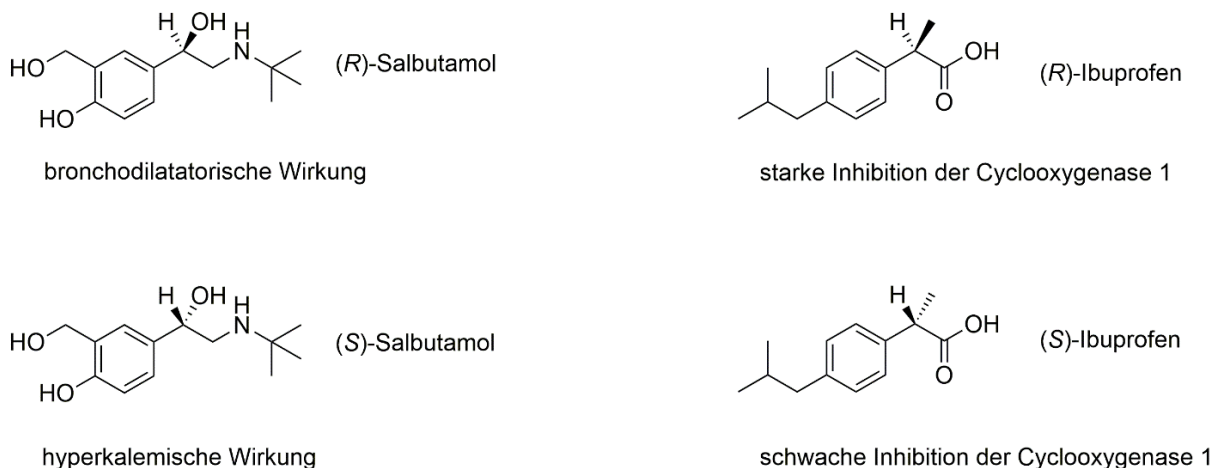


**Abb. 4.** Herstellung verschiedener Antibiotika-Derivate aus Penicillin G mithilfe verschiedener Acylasen [27].

Durch diese Selektivität werden darüber hinaus Kaskadenreaktionen ermöglicht, wodurch mehrere Reaktionsschritte in einem Reaktionsansatz ohne Aufarbeitung möglich sind [29]. Dies hat den weiteren Vorteil, dass nur die letzte Reaktion exotherm sein muss, was den Gesamtenergieverbrauch und die sonst für jeden Reaktionsschritt nötigen Chemikalien zum Verschieben des Gleichgewichtes auf die Produktseite stark reduziert. Durch die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums besitzen Enzyme nicht nur eine hohe Chemo- und Regio-, sondern meist auch eine sehr hohe Enantioselektivität, die es ihnen ermöglicht, chirale Moleküle in extrem hoher optischer Reinheit herzustellen.

Da gerade in der Biologie bzw. in der Medizin unterschiedliche Enantiomere verschiedene Wirkungen entfalten können, ist dies von enormem Vorteil bei der Herstellung von Medikamenten.

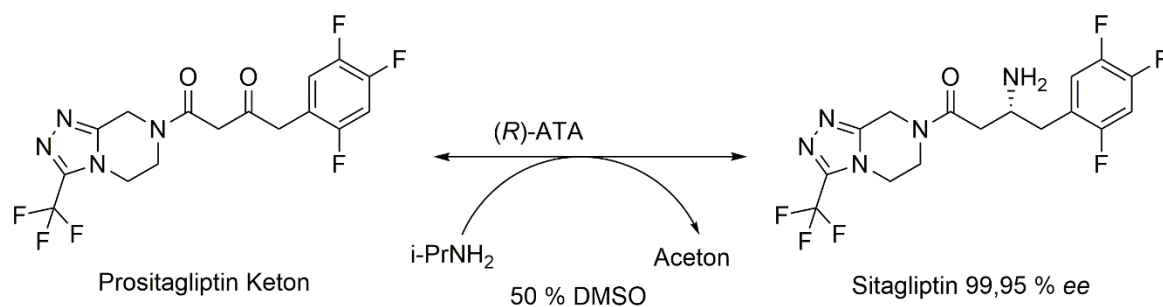
So ist (*R*)-Salbutamol bronchodilatatorisch und wirkt gegen Asthma, während (*S*)-Salbutamol hauptsächlich den Kalziumspiegel im Blut erhöht<sup>[30]</sup> (Abb. 5.). Dies kann zu Herzrhythmusstörungen führen. Ein weiteres Beispiel ist das bekannte Schmerzmittel Ibuprofen, bei dem das (*S*)-Enantiomer über hundertmal effektiver - in der für die Wirkung wichtigen Inhibition der Cyclooxygenase 1 - als das (*R*)-Enantiomer ist (Abb. 5.)<sup>[31]</sup>.



**Abb. 5.** Unterschiedliche medizinische Wirkweise verschiedener Enantiomere von Salbutamol und Ibuprofen

Mit enantiomerenreinen Substanzen ist es also möglich, die gewünschte Wirkung mit wesentlich geringeren Mengen zu erreichen und gleichzeitig unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden. Da der Anteil an weltweit neu eingeführten, chiralen Medikamenten von 40 % im Jahre 1992 auf fast 70 % im Jahre 2010 angestiegen ist<sup>[31]</sup>, ist dies von immer größerer Bedeutung.

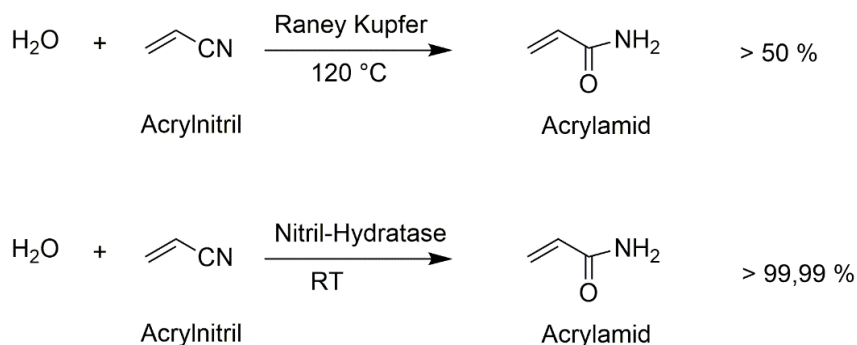
Diese Stereo-, Chemo-, und Regioselektivität, die hohe Effizienz, die Funktionsweise in Wasser, die Aktivität bei Raumtemperatur, die günstige Herstellung und die einfache Entsorgung machen Enzyme als biologische Katalysatoren zum idealen Instrument, um die chemische Produktion umweltfreundlicher und günstiger zu gestalten und sie so für die Anforderungen des 21. Jahrhunderts zu wappnen. So konnte z. B. mithilfe des optimierten *R*-selektiven Enzyms Transaminase von *Arthrobacter sp.* (Abb. 6.) bei der Herstellung des Antidiabetesmedikamentes Sitagliptin (*Januvia*) die Ausbeute um 10 % und die Gesamtproduktivität um 53 % gegenüber der Herstellung mit Rhodium-Katalysatoren gesteigert werden<sup>[32]</sup>. Gleichzeitig hat sich die Gesamtabfallmenge um 19 % reduziert<sup>[33]</sup>.



**Abb. 6.** Synthese von Sitagliptin mittels *R*-selektiver Transaminase ((*R*)-ATA)

Ein weiteres, positives Beispiel ist die Produktion von Acrylamid, was Verwendung in der Papierindustrie, der Abwasserbehandlung, der Pestizidherstellung und der Gelelektrophorese findet<sup>[32]</sup>. Traditionell wird es mithilfe eines Kupferkatalysators bei 120 °C aus Acrylnitril hergestellt, die Ausbeute beträgt über 50 %<sup>[34]</sup>.

Durch die Verwendung der Nitril-Hydratase kann diese Reaktion bei Raumtemperatur<sup>[34]</sup> mit >99,99 % Ausbeute stattfinden (Abb. 7.)<sup>[23]</sup>. Die Jahresproduktion an so hergestelltem Acrylamid beträgt 650 000 t/a allein in Japan<sup>[32]</sup>.



**Abb. 7.** Klassische<sup>[34]</sup> und enzymatische industrielle Synthese von Acrylamid aus Acrylnitril<sup>[23]</sup>

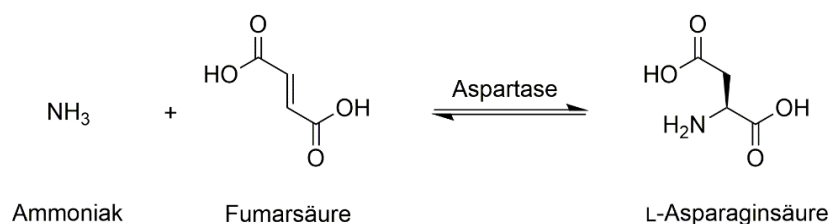
Neben der Anwendung zur Synthese von Feinchemikalien oder Medikamenten wie Antibiotika und Steroiden<sup>[22]</sup> finden Enzyme auch Verwendung in der Futtermittelindustrie oder in der Herstellung von Waschmitteln. Des Weiteren werden sie in der Textilindustrie, z. B. beim Färben von Jeans<sup>[32]</sup> oder in der Papierindustrie zum Abbau von Lignin<sup>[32]</sup> verwendet.

### 1.3. Enzyme in der Synthese

Trotz dieser beeindruckenden Eigenschaften und Beispiele sind Enzyme immer noch für den Einsatz in Lebewesen optimierte Katalysatoren, weshalb ihre dafür positiven Eigenschaften für die Anwendung in der technischen Chemie bisweilen von Nachteil sind. Dadurch konnte bisher keine komplette Umstellung der chemischen Produktion auf biokatalytische Verfahren stattfinden. So ist der größte Vorteil der Enzyme, ihre Selektivität, zugleich auch ihre größte Schwäche. Während chemische Methoden in der Regel auf ein sehr breites Spektrum an Molekülen anwendbar sind, akzeptieren Enzyme meist nur ihr natürliches Substrat neben - mit oft schlechterer Aktivität - strukturell und funktionell sehr ähnlichen Substanzen<sup>[35]</sup>. So beträgt z. B. die Aktivität einer Aldehyddehydrogenase aus *E. coli* für Propanal 27,35 U/mg, das aber um eine Methylgruppe kleinere Acetaldehyd wird mit 12,39 U/mg jedoch schon deutlich schlechter umgesetzt<sup>[36]</sup>. Mit Formaldehyd, welches eine Ethylgruppe weniger trägt, findet kein Umsatz statt<sup>[36]</sup>. Im Gegensatz dazu können eine Großzahl an Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäuren z. B. mittels Lithiumaluminiumhydrid zum Alkohol reduziert werden<sup>[37]</sup>. Da deshalb für jedes Herstellungsverfahren ein für das Substrat geeignetes Enzym gefunden werden muss, ist der Aufwand, einen für die Reaktion geeigneten Katalysator zu finden, wesentlich größer. Hinzu kommt, dass nach Schätzungen ca. 20 % aller Enzyme<sup>[38]</sup> von ihrem Substrat/Produkt inhibiert werden. Dies ist zwar eine wichtige Funktion, um die Stoffwechselwege in einer Zelle zu kontrollieren; für die Anwendung in der chemischen Industrie, wo hohe Produktkonzentrationen in den Reaktionsgefäßen (*time-space-yield*) für ein effizientes Verfahren nötig sind, ist es aber ein Problem. So stellt die Phosphofructokinase, welche ein Teil der ATP-produzierenden Glykolyse ist, ihre Aktivität bei einer Konzentration von nur ca. 1,5 mM ATP komplett ein<sup>[38]</sup>. Aus dem gleichen Grund sind viele Enzyme auch erst ab einer gewissen Substratkonzentration aktiv, so dass der maximal mögliche Umsatz nur mit hohem Zeitaufwand erreicht werden kann. Darüber hinaus können Enzyme in Zellen in Multienzymkomplexen vergemeinschaftet sein. Ohne ihren Enzympartner können sie ihre Aktivität komplett verlieren<sup>[39]</sup>. Zusätzlich herrschen in großtechnisch-chemischen Reaktoren andere Bedingungen als in den meisten Lebewesen, so dass Enzyme gegenüber organischen Lösungsmitteln, extremen pH-Werten oder hohen Temperaturen nicht immer die gewünschten Resistenzen aufweisen. So verliert z. B. die oben erwähnte Aldehyddehydrogenase ca. 90 % ihrer Aktivität bei einem pH-Wert unter 6 oder über 10. Auch verliert sie 40 % ihre Aktivität bei 50 °C, ab 60 °C ist sie inaktiv<sup>[36]</sup>. Darüber hinaus sind Enzyme oft labil gegenüber oxidativen Bedingungen, wenn sie nicht durch weitere Biomoleküle geschützt werden. Dies alles ist natürlich ein Nachteil. So müssen nicht nur für die gewünschten Reaktionen geeignete Enzyme gefunden werden, diese müssen auch meistens mittels Protein-Engineering (Kapitel 1.6) so verändert werden, dass sie die gewünschten Eigenschaften besitzen. Da moderne Verfahrensentwicklungen aber schnell und risikoarm entwickelt werden müssen<sup>[40]</sup> und die Herstellung von Enzymen eher teuer ist, werden sie bisher eher selten eingesetzt. Darüber hinaus haben nahezu alle Enzyme weitere, systemische Nachteile, die von ihrer Enzymklasse abhängig sind. So wird bei der Verknüpfung zweier Moleküle (z. B. mit Ligase oder Kinasen) oder bei der Umwandlung von einer funktionellen Gruppe in eine andere (z. B. mit Dehydrogenase) zusätzlich ein Cosubstrat wie NADH oder ATP in stöchiometrischen Mengen verbraucht. Dabei wird jedoch nur ein kleiner Teil der Atome auf das Substratmolekül übertragen, der größere Molekülrest der Cosubstrate bleibt als Abfall zurück. Dies sorgt für höhere Prozesskosten und für eine schlechte Atomökonomie, was den Prinzipien der Grünen Chemie zuwiderläuft.

---

Zwar kann dieses Problem oft durch den Einsatz von lebenden Zellen umgangen werden, da diese die benötigten Cosubstrate effizient recyceln<sup>[41]</sup>. Der Stoffwechsel von Zellen ist allerdings nicht völlig berechenbar. Aus diesem Grund kann es vorkommen, dass ein größerer Prozentsatz des eingesetzten Substrates unerwünscht umgewandelt oder verstoffwechselt wird<sup>[42]</sup>. Auch lassen sich so zelltoxische Substanzen nur mit starken Einschränkungen produzieren. Dies hat zur Folge, dass die industrielle Verwendung von Enzymen, welche Cosubstrate benötigen, nur bei der Produktion von wertvollen Molekülen wie Medikamenten wirtschaftlich sein kann. Enzyme, die hingegen ohne Cosubstrate auskommen, wie Lipasen oder Isomerasen, sind wesentlich wirtschaftlicher und können so selbst einfachsten chemischen Verfahren Konkurrenz machen. So wird z. B. mithilfe der Glucoseisomerase seit 1965 Glucose-Fructose-Sirup als Süßungsmittel hergestellt, obwohl für die chemische Konkurrenzreaktion lediglich der Einsatz von preiswerter Säure notwendig ist<sup>[43]</sup>. Die Produktion von Glucose-Fructose-Sirup im Jahre 2002 betrug allein in den USA über 12 Gigatonnen<sup>[43]</sup>. Während Isomerasen und Lipasen jedoch für die Synthese von Molekülen nur bedingt bzw. gar nicht geeignet sind, ist die Klasse der Lyasen in der Lage, ohne Cosubstrat zwei Moleküle unter Verbrauch einer Doppelbindung miteinander zu verknüpfen. Damit ist es theoretisch möglich, eine Atomökonomie von 100 % zu erreichen. Ein Beispiel ist die oben beschriebene Synthese von Acrylamid (Abb. 7.) oder die Synthese von L-Asparaginsäure (Abb. 8.) durch den von der Ammoniaklyase (Aspartase) katalysierten Einbau von Ammoniak in Fumarsäure. L-Asparaginsäure ist der Ausgangsstoff für die im Kilotonnen-Maßstab stattfindende Produktion des künstlichen Süßungsmittels Aspartam<sup>[22]</sup>.

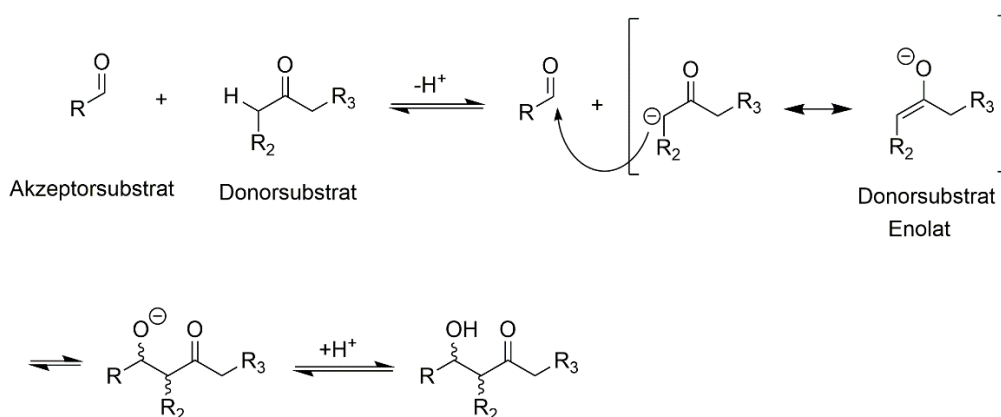


**Abb. 8.** Synthese von L-Asparaginsäure mittels Aspartase aus Fumarsäure und Ammoniak

Lyasen werden nach der Art der Atome, welche sie miteinander verbinden, klassifiziert. So gibt es Lyasen, die C-C, C-O, C-N oder andere Bindungen knüpfen<sup>[44]</sup>. Die Unterklasse der Lyasen, welche C-C Bindungen bilden kann, wird Aldolasen genannt. Da Kohlenstoffgerüste den Hauptteil aller wichtigen organischen Verbindungen ausmachen, liegt in Lyasen ein enormes industrielles Potenzial, weswegen sie besonders interessant sind.

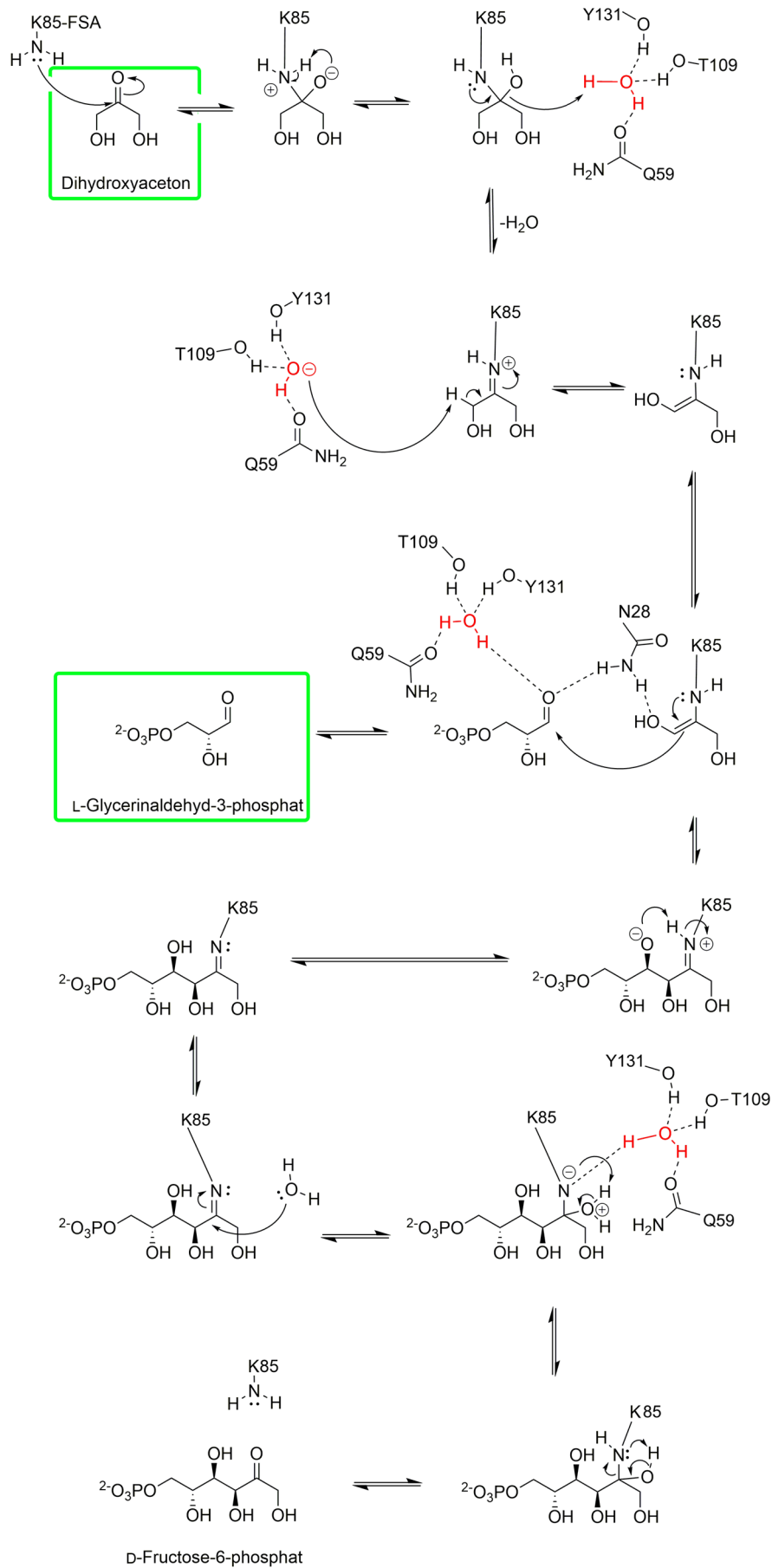
## 1.4. Aldolasen in der enzymatischen Synthese

Aldolasen verknüpfen mittels Aldolreaktion reversibel zwei Moleküle durch eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung und bilden dabei in der Regel zwei definierte Stereozentren aus (asymmetrische Synthese)<sup>[45]</sup>. Dabei wird immer ein CH-acider Aldehyd oder ein Keton mit einem anderen Aldehyd oder Keton verknüpft<sup>[46]</sup>. Bei der Aldolreaktion wird die CH-acide Verbindung - meist ein Keton - deprotoniert, so dass ein elektronenreiches Enolat entsteht<sup>[47]</sup>; es wird (Elektronen)-Donorsubstrat genannt. Dieses kann nun den partiell positiv geladenen und damit elektronenarmen Carbonylsauerstoff eines anderen Moleküls nukleophil angreifen. Dieses Molekül wird (Elektronen)-Akzeptorsubstrat genannt, es ist meist ein Aldehyd<sup>[47]</sup> (Abb. 9.). Dabei sind die Aldolasen meist sehr spezifisch gegenüber ihrem Donorsubstrat, während sie gegenüber ihrem Akzeptorsubstrat eine größere Substrattoleranz aufweisen<sup>[47]</sup>.

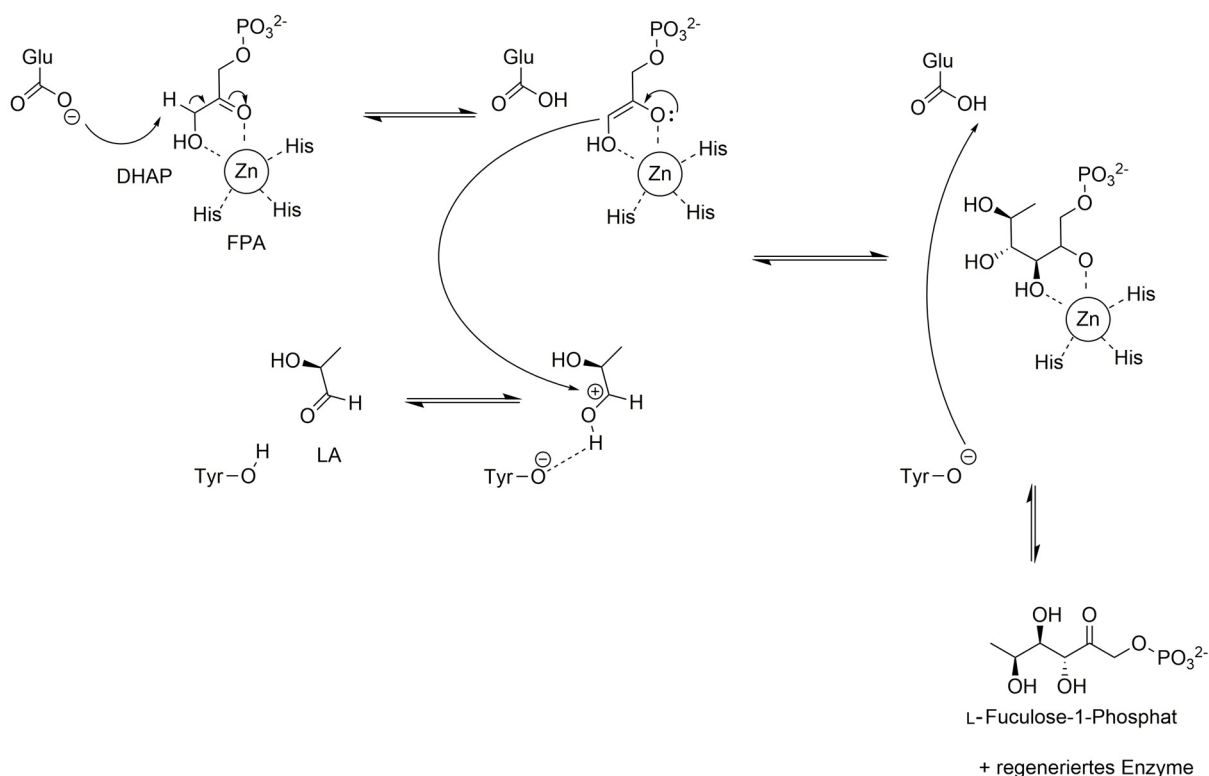


**Abb. 9.** Genereller Reaktionsmechanismus einer Aldolreaktion

In der Natur kommen zwei Klassen von Aldolasen vor, die sich durch ihren Reaktionsmechanismus unterscheiden. Klasse-I-Aldolasen besitzen einen Lysinrest im aktiven Zentrum, dessen  $\epsilon$ -Aminogruppe eine Schiff'sche-Base mit dem Carbonylkohlenstoff des Donorsubstrates ausbildet und damit als Elektronensenke fungiert<sup>[44]</sup>. Die Bildung dieser Base wird mithilfe benachbarter Aminosäuren, wie z. B. Glutamat säurekatalytisch unterstützt. Das dabei entstehende Wasser wird durch eine Aminosäurekonstellation im aktiven Zentrum in räumlicher Nähe zur Schiff'schen-Base fixiert. Das durch die Bildung der Schiff'schen-Base entstandene protonierte Carbanion wird dabei - durch Resonanz mit seiner Enaminform - stabilisiert, bis es mit einem Akzeptorsubstrat reagieren kann<sup>[44]</sup>. Die Ablösung des Substrates erfolgt wieder säurekatalytisch durch Hydrolyse mit dem gebundenen Wasser<sup>[44]</sup> (Abb. 10.). Klasse-II-Aldolasen haben ein zweiwertiges Metallion, wie z. B. Zink, welches durch die Polarisation der Carbonylgruppe des Substrates den gebildeten Übergangszustand stabilisiert<sup>[48]</sup>. Zunächst koordiniert das CH-acide Hydroxyketon in einem 5-gliedrigen Übergangszustand mit dem Zinkion<sup>[49]</sup>. Das acide Proton wird durch einen Glutamatrest abstrahiert, wodurch ein Endiolat-Anion entsteht. Dieses kann nun den - durch ein phenolisches Tyrosin protonierten und somit aktivierten - Aldehyd nukleophil angreifen<sup>[44]</sup>. Anschließend wird das deprotonierte Tyrosin durch das Proton des Glutamatrestes reprotoniert und das Enzym somit regeneriert (Abb. 11.).

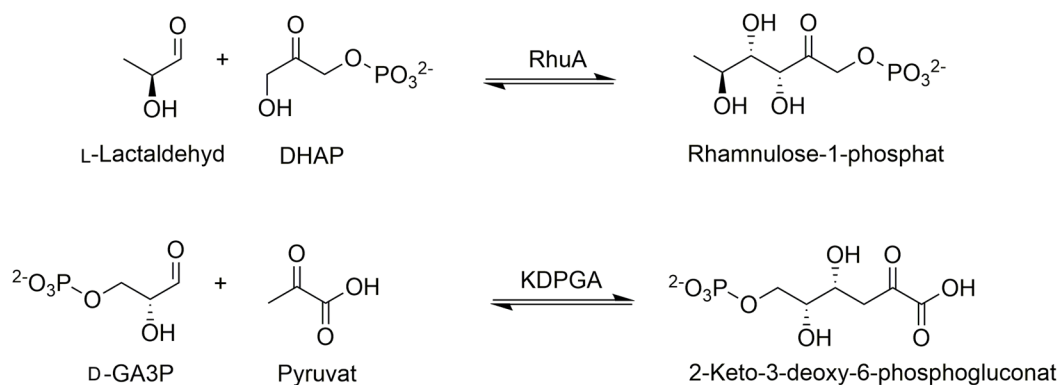






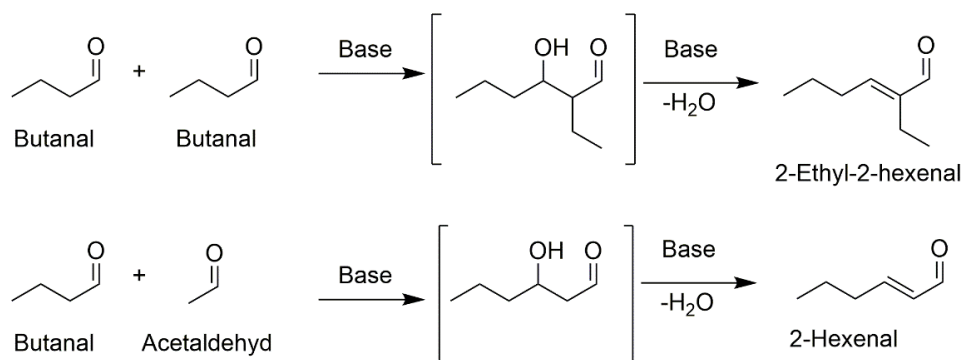
**Abb. 11.** Katalysemechanismus von Klasse-II-Aldolasen am Beispiel der Fucose-1-Phosphat-Aldolase mit ihren Substraten Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und L-Lactaldehyd (LA) <sup>[44]</sup>

Klasse-I-Aldolasen sind häufig in höheren Eukaryoten zu finden und bilden oft Tetramere. Klasse-II-Aldolasen hingegen sind häufig in Bakterien, Pilzen und Algen anzutreffen<sup>[48]</sup>. In der Natur werden sie meist im katabolen<sup>[50,51,51]</sup>, selten auch im anabolen Kohlenhydratstoffwechsel verwendet (Abb. 12.)<sup>[52]</sup>.



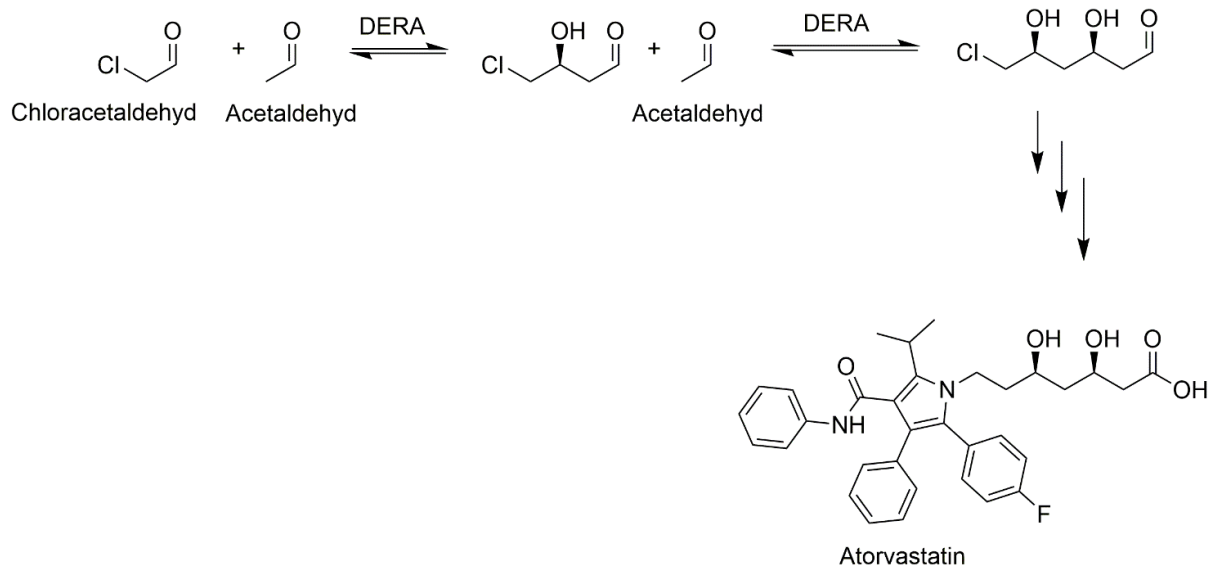
**Abb. 12.** Synthese/Abbau des Zuckerphosphates Rhamnulose-1-phosphat mittels Rhamnulose-1-phosphat-Aldolase (RhuA) aus L-Lactaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) sowie des Desoxyzuckers 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat mittels 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat-Aldolase (KDPGA) aus D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat<sup>[44]</sup>

Der Vorteil der Aldolasen gegenüber der chemischen Aldolreaktion besteht in ihren milden Reaktionsbedingungen und ihrer Regioselektivität, wodurch die Vielzahl an Nebenprodukten vermieden werden, die durch Aldolkondensationen oder sequenzielle Aldolreaktionen entstehen. Darüber hinaus entstehen bei Aldolreaktionen meist neue Chiralitätszentren. Werden diese nicht stereoselektiv gebildet, steigt die Anzahl der unterschiedlichen Produkte im Reaktionsansatz stark an. Diese Nachteile machen insbesondere die gekreuzte chemische Aldoladdition für eine industrielle Verwendung nahezu unbrauchbar, weshalb großtechnisch hauptsächlich Aldolkondensationen verwendet werden. Durch die dabei stattfindende Eliminierung werden die Aldolzentren zerstört und die Anzahl der Reaktionsprodukte verringert, was die Produktion kontrollierbar macht. In der Regel werden die dabei entstandenen  $\alpha/\beta$ -ungesättigten Produkte anschließend hydriert. Auf diese Weise wird z. B. 2-Ethyl-2-hexenal<sup>[53]</sup> durch die Homoaldolkondensation von Butanal hergestellt und weiter zu 2-Ethylhexanol reduziert, welches im Megatonnenmaßstab in der Industrie für die Herstellung von PVC-Weichmachern benötigt wird<sup>[54]</sup>. Ein weiteres Beispiel ist die Herstellung von 2-Hexenal aus Butanal und Acetaldehyd, welches für die Parfüm-Industrie Bedeutung besitzt (Abb. 13.)<sup>[53]</sup>.



**Abb. 13.** Industriell wichtige Aldolkondensationsreaktionen

Durch die Chemo- und Regioselektivität von Enzymen existiert dieses Eliminierungsproblem bei Aldolasen nicht, so dass diese in der Lage sind, Aldolprodukte in hoher Reinheit herzustellen und damit neue Synthesewege zu ermöglichen. Die meisten Aldolasen sind jedoch evolutionär auf phosphorylierte und andere hoch polare Substrate spezialisiert<sup>[55]</sup>, wie aus den gezeigten Reaktionsbeispielen ersichtlich wird (Abb. 11., Abb. 12.). Dies ist problematisch, da phosphorylierte Substrate für die Industrie wenig relevant und teuer in der Herstellung sind<sup>[56]</sup>. Die dabei entstehenden Produkte müssen anschließend wieder aufwendig dephosphoryliert werden<sup>[55,57]</sup>, weshalb Aldolasen, welche unphosphorylierte Substrate akzeptieren, von eigentlichem kommerziellen Interesse sind. So wird z. B. die 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphat-Aldolase (DERA, E.C. 4.1.2.4) industriell zur stereoselektiven Herstellung der für die pharmazeutische Wirkung verantwortlichen, chiralen Statin-Seitenkette des Cholesterinsenkers Atorvastatin verwendet (Abb. 14.)<sup>[58,59,59]</sup>.

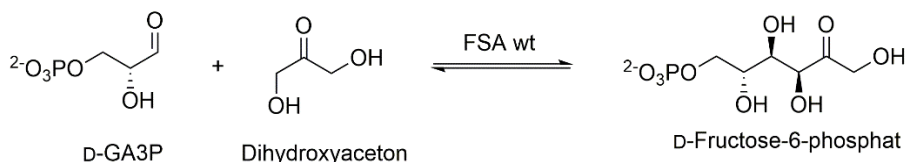


**Abb. 14.** Herstellung der Atorvastatinseitenkette durch die DERA aus einfachen Aldehydvorstufen

Eine weitere Aldolase, welche nicht phosphorylierte Substrate verwenden kann, ist die Fructose-6-phosphat-Aldolase (FSA)<sup>[55]</sup>.

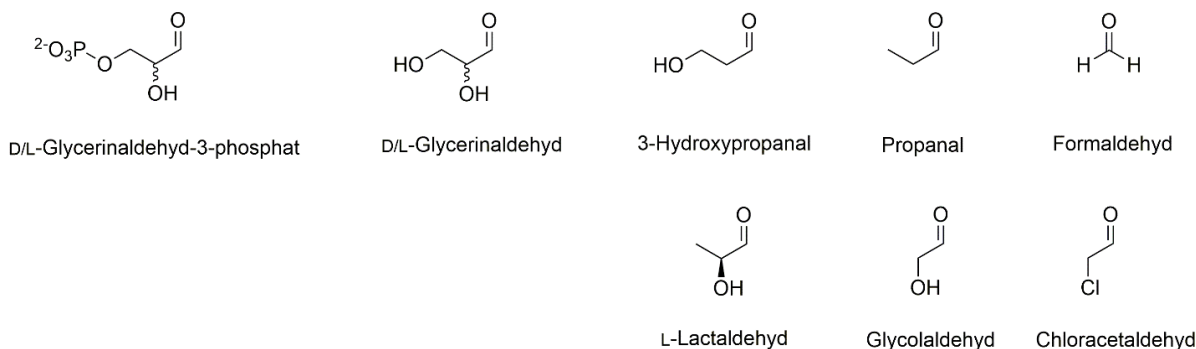
## 1.5. Fructose-6-phosphat-Aldolase

Die Fructose-6-phosphat-Aldolase (FSA) ist eine thermostabile<sup>[60,61]</sup> Klasse-I-Aldolase aus *E. coli* <sup>[60]</sup>. Ihre namensgebende Reaktion ist die Katalyse der reversiblen, stereoselektiven 3*S*,4*R*(*syn*)-Aldoladdition von Dihydroxyaceton (DHA) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D-G3P) zu D-Fructose-6-phosphat (D-F6P)(Abb. 10. und Abb. 15.)<sup>[60]</sup>.



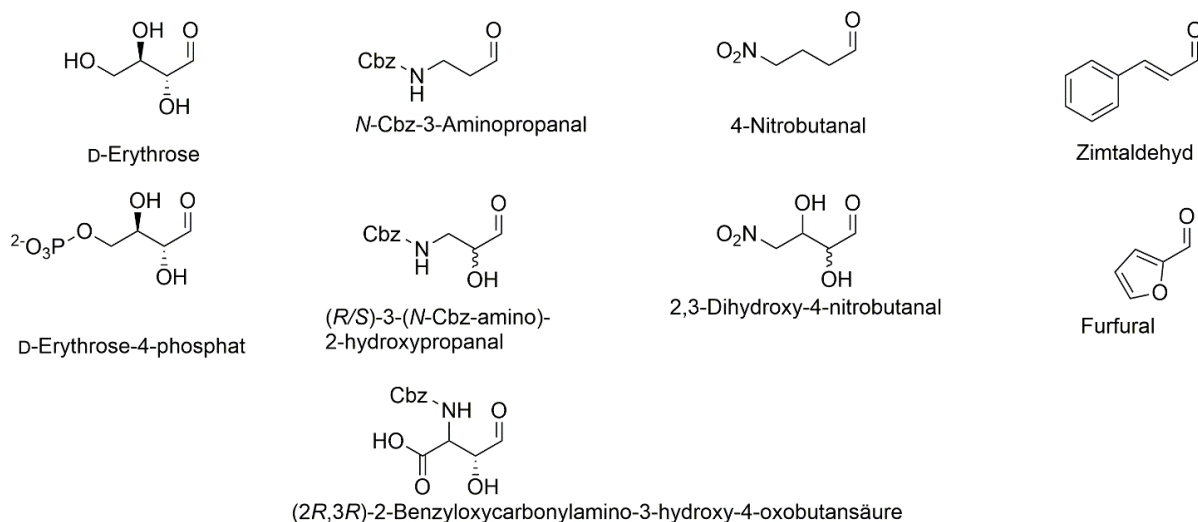
**Abb. 15.** Namensgebende Reaktion der Fructose-6-phosphat-Aldolase (FSA): Die Synthese/Spaltung von D-Fructose-6-phosphat aus D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D-G3P) und Dihydroxyaceton

Die FSA akzeptiert darüber hinaus als Akzeptorsubstrat eine große Zahl an nicht phosphorylierten Aldehyden, wie z. B. D/L-Glycerinaldehyd<sup>[57]</sup> und alle davon abgeleiteten kleineren Strukturanaloga bis hin zu Formaldehyd (Abb. 16.)<sup>[62][57,63]</sup>. Lediglich Acetaldehyd bildet dabei eine noch nicht verstandene Ausnahme. Interessanterweise wird jedoch Chloracetaldehyd als Substrat akzeptiert<sup>[64]</sup>.



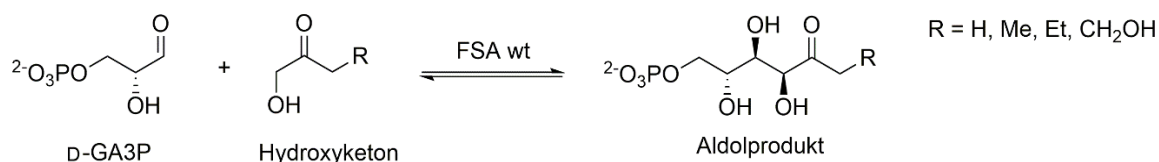
**Abb. 16.** Von FSA wt akzeptierte, von Glycerinaldehyd-3-phosphat abgeleitete Akzeptorsubstrate<sup>[57,62,65]</sup>

Darüber hinaus werden größere Moleküle, wie D-Erythrose<sup>[57]</sup>, D-Erythrose-4-phosphat<sup>[57]</sup> und aromatische Aldehyde<sup>[66,67]</sup>, wie Furfural<sup>[68]</sup> und Zimtaldehyd<sup>[67]</sup> als Akzeptorsubstrat toleriert (Abb. 17).



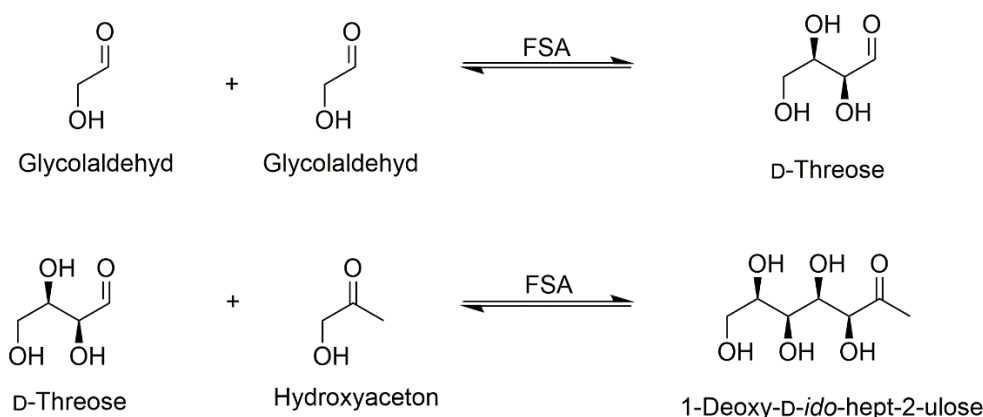
**Abb. 17.** Größere von FSA umgesetzte Aldehyde<sup>[65,66,68,69]</sup>

Es scheint also, dass der Akzeptoraldehyd eine große Varianz bezüglich der Kohlenstoffkettenlänge und deren Substituenten aufweisen darf, wobei an Position C2 eine polare Hydroxy- oder Halogengruppe, wie z. B. im Glycerinaldehyd oder Chloracetaldehyd vorteilhaft ist. An Position C3 scheint eine polare Gruppe mittlerer Größe, wie eine Carbonsäure oder ein Teil eines Furanringes akzeptabel und an C4 werden sowohl Heteroatome als auch größere und aromatische Verzweigungen akzeptiert. Im Gegensatz dazu weist die FSA gegenüber ihren nukleophilen Donorsubstraten jedoch eine hohe Selektivität auf. Lediglich Dihydroxyaceton<sup>[57]</sup>, Hydroxyaceton<sup>[57]</sup>, Glycolaldehyd<sup>[65]</sup> und Hydroxybutanon<sup>[55]</sup> werden umgesetzt (Abb. 18.).



**Abb. 18.** Durch FSA wt katalysierte Aldolreaktion von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat<sup>[60,70]</sup>

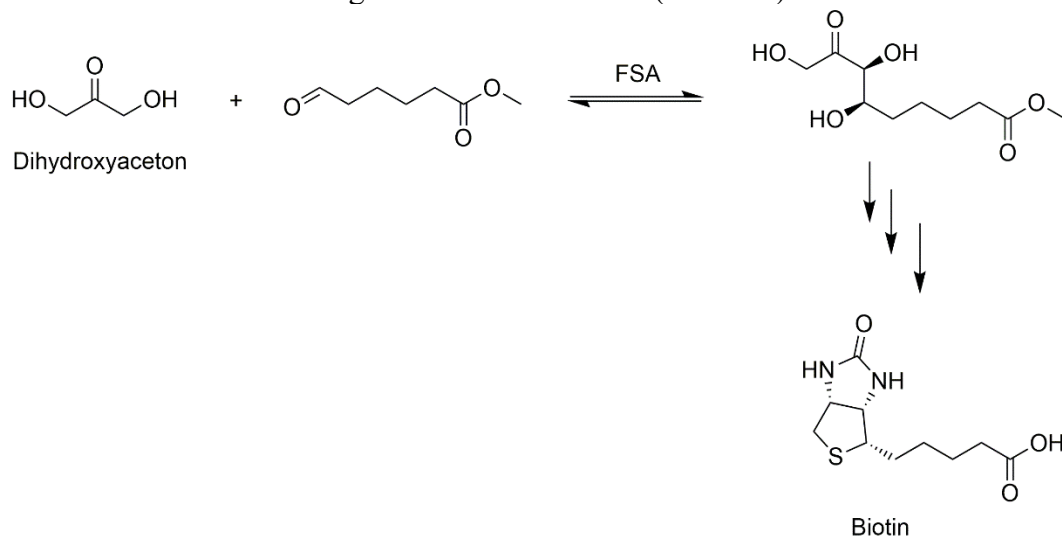
Interessanterweise kann Glycolaldehyd sowohl als Donor- als auch als Akzeptorsubstrat fungieren, was eine Homoaldolreaktion möglich macht, wodurch sich z. B. aus Glycolaldehyd D-(-)-Threose herstellen lässt<sup>[65]</sup>. Des Weiteren kann dies auch für dreifache Aldoladditionen verwendet werden<sup>[65]</sup>, wobei entweder die aus Glycolaldehyd entstandene D-Threose als Akzeptorsubstrat für z. B. DHA dienen kann, oder ein weiterer Aldehyd reagiert zunächst mit einem Äquivalent Glycolaldehyd zu einem neuen Akzeptorsubstrat, das dann mit einem weiteren Glycolaldehydmolekül zum doppelten Aldolprodukt reagiert (Abb. 19.)<sup>[65]</sup>.



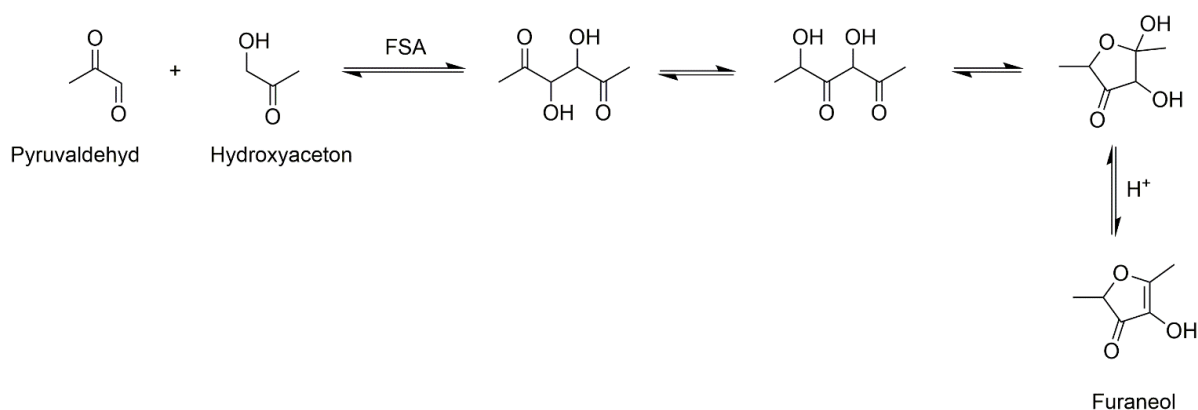
**Abb. 19.** FSA-katalysierte Homoaldolreaktion von Glycolaldehyd zu D-Threose sowie die anschließende Kreuzaldolreaktion mit Hydroxyaceton zu 1-Deoxy-D-ido-hept-2-ulose<sup>[65]</sup>

Unphosphorylierte Fructose wird nicht bzw. sehr schlecht als Substrat akzeptiert<sup>[48]</sup>, was vermutlich auf den geringen prozentualen Anteil an der offenkettigen Form in Lösung zurückzuführen ist. Die cyclisierte Form wird nicht umgesetzt.

Kommerziell wird zur Zeit von der *Dutch State Mines* untersucht, ob mithilfe der FSA im industriellen Maßstab das Nahrungsergänzungsmittel (+)-Biotin (Abb. 20.)<sup>[59]</sup> und der Geschmacksstoff Furaneol® hergestellt werden können (Abb. 21.)<sup>[71][59]</sup>.

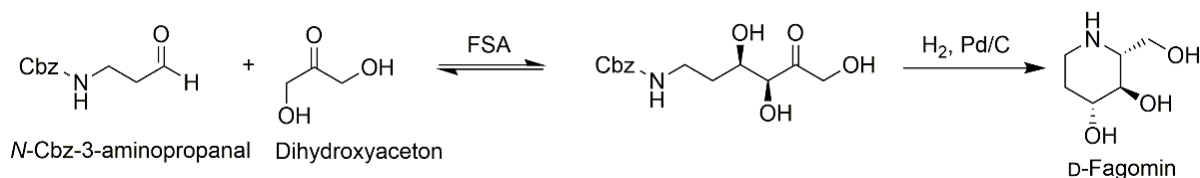


**Abb. 20.** Mögliche Syntheseroute zur Herstellung von Biotin mithilfe der FSA



**Abb. 21.** Herstellung von Furaneol® mittels FSA aus Pyruvaldehyd und Hydroxyacetone<sup>[71]</sup>

Darüber hinaus gab es Versuche, D-Fagomin herzustellen, das inhibitorische Wirkung auf die  $\alpha/\beta$ -Glucosidase und  $\alpha/\beta$ -Galactosidase von Säugetieren besitzt<sup>[69]</sup>, wodurch der Abbau von Polysacchariden im Dünndarm verlangsamt wird (Abb. 22.). Dadurch steigt der Insulinspiegel nach Mahlzeiten weniger stark an, was Diabetikern zugutekommen könnte.



**Abb. 22.** Synthese von D-Fagomin durch die FSA

Trotz dieser vielfältigen Reaktionen sind die Synthesemöglichkeiten durch die Substratelektivität der FSA stark eingeschränkt. Um die Substrattoleranz von Enzymen wie der FSA zu verändern und ihr Einsatzspektrum zu erweitern, verwendet man die Methode des Protein-Engineerings.

## 1.6. Bekannte FSA-Varianten durch Protein-Engineering

Beim Protein-Engineering werden verschiedene Aminosäuren eines Enzyms durch andere ausgetauscht, um so die Eigenschaften wie Stabilität, Selektivität oder Substratspezifität zu verändern. Dafür gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: Zum Einen die gezielte, rational geplante Veränderung von einer oder mehreren Aminosäuren (Rationales Design), zum Anderen der zufällige Austausch von einzelnen oder mehrere Aminosäuren, bis hin zum ganzen Austausch von Proteindomänen (Gelenkte Evolution). Beim rationalen Proteindesign ist es zwingend notwendig, dass die dreidimensionale Struktur des Enzyms bekannt ist. Anhand dieser wird entschieden, welche Aminosäuren ausgetauscht werden könnten, um z. B. mehr Platz oder eine polarere/unpolarere Umgebung im aktiven Zentrum zu generieren. Dadurch können beachtliche, wenn auch nicht immer die best möglichen Ergebnisse erzielt werden. Der Arbeitsaufwand ist jedoch begrenzt. Bei den verschiedenen Methoden der Gelenkten Evolution ist die dreidimensionale Struktur des Enzyms hingegen prinzipiell nicht notwendig. Es werden zufällig verschiedene Aminosäuren oder Proteinabschnitte ausgetauscht und der Effekt auf die Katalyseeigenschaft des Enzyms hin untersucht. Da mit dieser Methode jedoch bei völlig zufälliger Mutagenese eine nicht handhabbare Anzahl an Mutanten erzeugt würde (Gleichung 1.), wovon nur ein Bruchteil untersucht werden kann, werden meist nur eine eingeschränkte Anzahl an Aminosäuren in ausgewählten Positionen ausgetauscht (fokussierte Mutagenese), um die Anzahl der Mutanten in Grenzen zu halten.

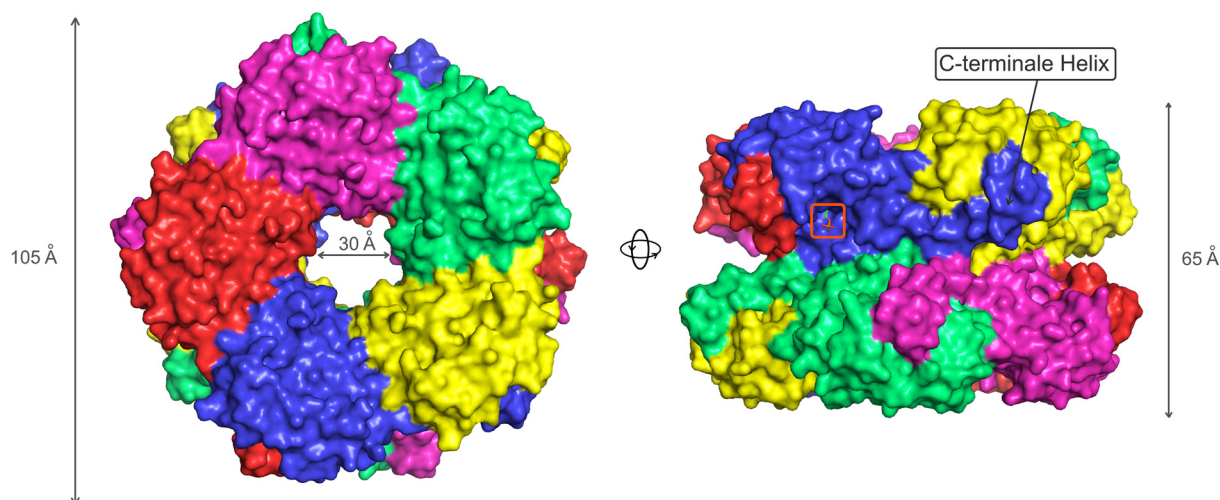
Für A als Anzahl der Aminosäurenpositionen der FSA  
und B als Anzahl der Aminosäuren je Position,  
ergibt sich als Anzahl aller möglichen FSA-Mutanten  $B^A$ .  
Mit den Werten  $A = 220$  und  $B = 20$  bedeutet dies daher  
 $20^{220} = 1,685 \times 10^{286}$  mögliche FSA-Mutanten.

**Gleichung 1:** Anzahl an möglichen FSA-Varianten bei einem kombinierten Austausch aller Aminosäuren

Um die trotzdem dabei anfallende enorme Anzahl an Mutanten zu analysieren, ist darüber hinaus ein Schnelltest (Assay) nötig, mithilfe dessen alle erzeugten Varianten in miniaturisierten Reaktionen auf ihre gewünschten katalytischen Eigenschaften hin untersucht werden können (*Screening*). Der Arbeitsaufwand ist trotzdem erheblich und der Erfolg nicht immer garantiert. Eine gute Methode, um die Vorteile beider Methoden zu kombinieren und ihre jeweiligen Nachteile zu reduzieren, ist der *combinatorial active-site saturation test* (CAST)<sup>[72]</sup>. Hierbei wird anhand der dreidimensionalen Proteinstruktur rational entschieden, welche Aminosäurepositionen wahrscheinlich einen Effekt auf die gesuchte Eigenschaft, z. B. die Substrattoleranz haben und welche Aminosäuren sich dabei wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen und synergistische Effekte ausbilden. Anschließend werden diese Positionen einer kombinierten Zufallsmutagenese unterworfen. Dadurch sinkt die Anzahl der in jedem Schritt zu untersuchenden Mutanten signifikant, während die Wahrscheinlichkeit, Varianten mit der gewünschten Eigenschaft zu finden, deutlich ansteigt. Da durch den kombinatorischen Austausch von Aminosäuren die Anzahl an zu untersuchenden Enzymvarianten mit jeder zusätzlichen Aminosäureposition aber exponentiell steigt, hat es sich in der Praxis bewährt, nur 2-3 Aminosäurepositionen in Kombination auszutauschen. Dadurch reduziert sich die Anzahl an zu untersuchenden Varianten auf ca.  $3-8 \times 10^3$ . Es gibt zwar *Screening*-Methoden, mit welchen man sehr viele Enzymvarianten (ca.  $10^8$  Varianten) innerhalb weniger Stunden analysieren kann<sup>[73]</sup>; diese Technik ist jedoch nur in Spezialfällen anwendbar.

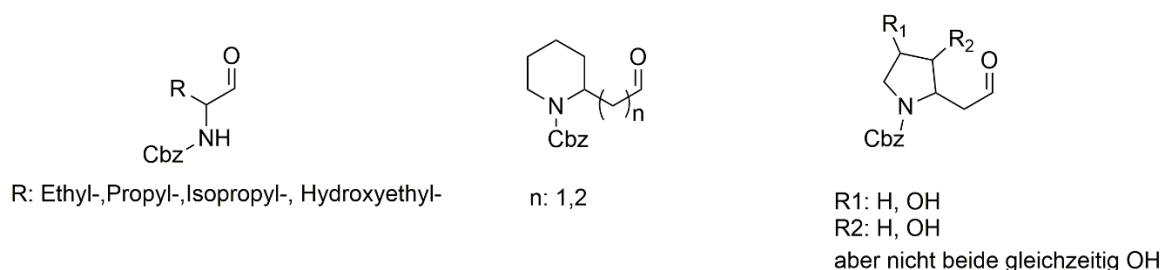
Leider sind nicht alle Proteine für das Protein-*Engineering* geeignet. In der Regel wird durch einen Aminosäureaustausch auch die Stabilität des Enzyms negativ beeinflusst.

Dadurch kann es vorkommen, dass die Tertiärstruktur so verändert wird, dass das Protein bereits bei niedrigen Temperaturen denaturiert und somit inaktiv wird. Unter normalen Laborbedingungen wird eine solche Mutante generell als unbrauchbar klassifiziert da Thermolabilität für den Einsatz von Enzymen im präparativen Synthesemaßstab ein Problem darstellt. Da die FSA jedoch eine sehr hohe Thermostabilität<sup>[48]</sup> sowie eine hohe Toleranz gegenüber pH-Schwankungen aufweist<sup>[48]</sup>, ist sie für Mutageneseexperimente ideal geeignet. Die hohe Stabilität ist dabei wahrscheinlich auf ihre Quartärstruktur zurückzuführen, wobei zehn FSA-Monomere ein zu einem Doppelring angeordnetes Decamer bilden. In diesem sind die einzelnen FSA-Proteine untereinander durch ihre C-terminalen Helices über große Kontaktflächen durch nicht kovalente Wechselwirkungen verbunden (Abb. 23.), was wahrscheinlich die Gesamtstabilität erhöht<sup>[74]</sup>.



**Abb. 23.** Mit PyMOL<sup>[75]</sup> dargestellte Kristallstruktur der FSA<sup>[74]</sup>. Die 10 Untereinheiten sind verschiedenfarbig dargestellt, die Untereinheiten des oberen und des unteren Rings haben jeweils das gleiche Farbspektrum. Das in eine Untereinheit eingefügte Substrat D-Fructose-6-phosphat<sup>[47]</sup> ist nur in der seitlichen Darstellung sichtbar und orange umrandet.

Bisher wurden verschiedene FSA-Varianten zur Erweiterung des Akzeptorsubstratspektrums hergestellt. So kann z. B. die FSA-Variante A129S/A165G  $\alpha$ -Methyl substituierte Aldehyde als Akzeptorsubstrat verwenden, während z. B. die Variante L107Y/A129G/R134P/A165G/S166G in der Lage ist, Cbz-geschützte Pyrrolidin- und Piperidinaldehyde zu akzeptieren (Abb. 24.)<sup>[76]</sup>.



**Abb. 24.** Ausgewählte Beispiele für ein durch Mutagenese erweitertes Aldehydsubstratspektrum der FSA<sup>[76]</sup>

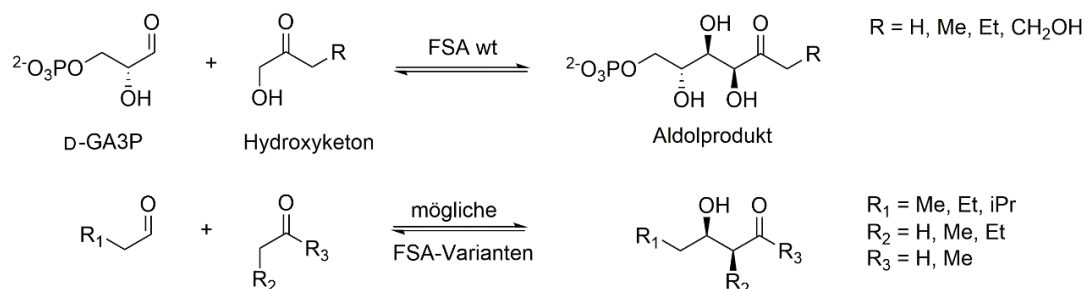


Zur Erweiterung des Donorsubstratspektrums wurden bisher nur die FSA-Variante D6H erstellt, welche Acetaldehyd, Aceton, Butanon und Cyclopentanon als Donorsubstrat akzeptiert<sup>[77]</sup>. Die Substratakzeptanz ist jedoch gering, so dass Reaktionen lediglich mit dem hoch affinen, aber phosphorylierten Akzeptorsubstrat Glycerinaldehyd-3-phosphat gute Ergebnisse liefert<sup>[77]</sup>. Darüber hinaus gab es verschiedene Mutationsexperimente, um die Geschwindigkeit und Selektivität der FSA gegenüber bekannten Substraten zu verbessern<sup>[67,76,78,79,80]</sup>. Erwähnenswert ist hierbei die FSA-Variante A129S, die einen 17-fach höheren  $K_{cat}/K_m$ -Wert für DHA aufweist als der Wildtyp<sup>[78]</sup>. Da es extrem unwahrscheinlich ist, dass in der Natur diese einfache Punktmutation, welche die Katalyseeffizienz so stark erhöht, nicht vorkommt, ist dies ein starkes Indiz dafür, dass die natürliche Reaktion der FSA nicht die Synthese/Spaltung von D-Fructose-6-phosphat ist.

---

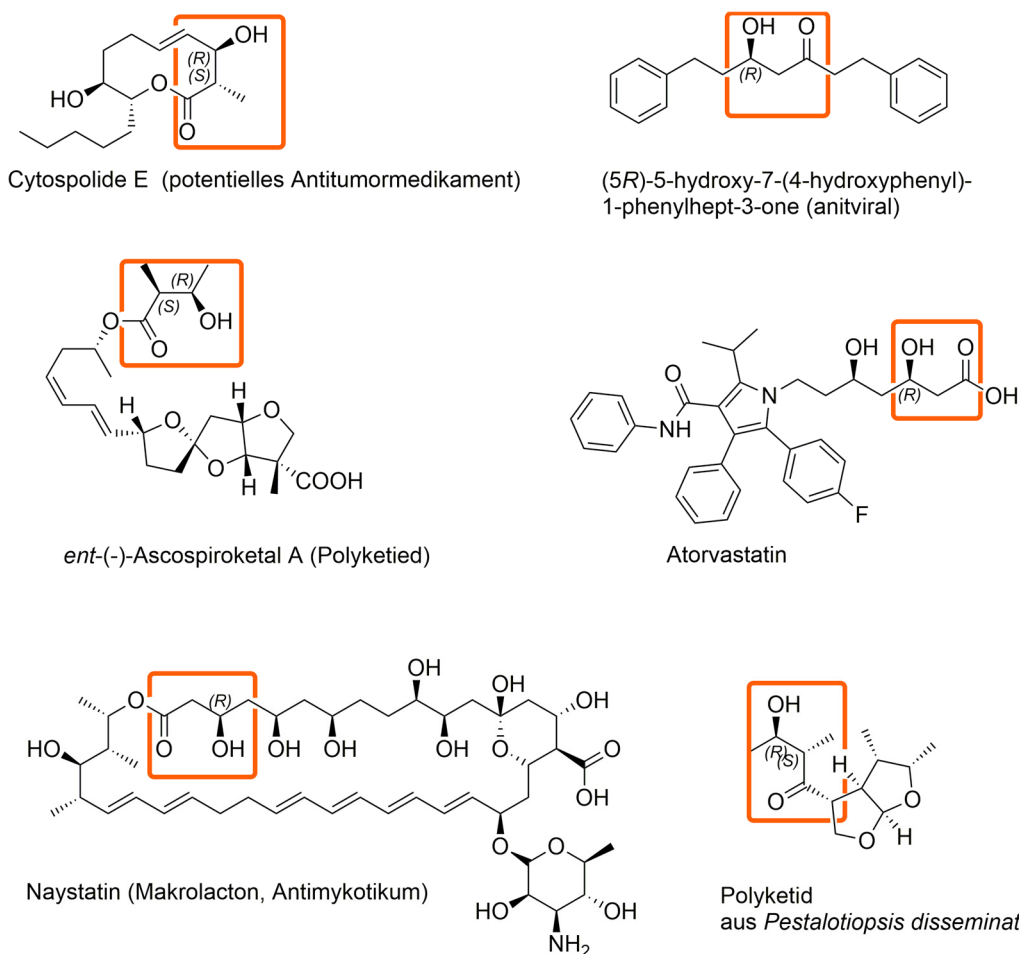
## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Erweiterung des beschränkten FSA-Donorsubstratspektrums<sup>[70]</sup>, um so neue und umweltverträgliche Synthesemöglichkeiten für Aldolprodukte zu schaffen. Der Fokus lag dabei auf der Erzeugung von FSA-Varianten, welche auch nicht hydroxylierte Aldehyde oder Ketone als Donor verwenden können (Abb. 25.).



**Abb. 25.** Bekannte Donorakzeptanz der FSA wt sowie gewünschte Donorakzeptanz als Ziel dieser Arbeit

Die dadurch stereospezifisch entstehenden  $\beta$ -Hydroxyketone oder  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -alkylaldehyde kommen als Strukturelement in verschiedenen Naturstoffen<sup>[81,82]</sup>, wie Polyketiden<sup>[61][83,84]</sup> oder Makrolactonen<sup>[61]</sup> sowie in Medikamenten<sup>[61,85,86]</sup> vor (Abb. 26.) und könnten somit möglicherweise zu neuen Syntheserouten derartiger Natur- und Wirkstoffe führen.

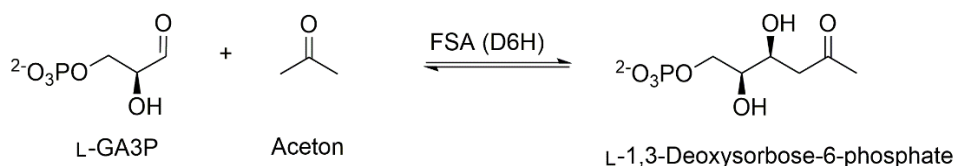


**Abb. 26.** Beispiele von  $\beta$ -Hydroxyketon-Strukturmotiven in Polyketiden, Makrolactonen und Medikamenten



Um dieses Ziel zu erreichen, sollten sowohl die Methode des rationalen Proteindesigns als auch die des *combinatorial active-site saturation test* (CAST)<sup>[72]</sup> angewandt werden. Deren Effizienz sollte mittels Bioinformatik und *Data Mining* optimiert werden. Für das hierfür benötigte Hochdurchsatzscreening sollte ein robustes und selektives Assay zur Bewertung der erzeugten Varianten erstellt und getestet werden. Zusätzlich war es vorgesehen, die so gefundenen Enzymvarianten bezüglich ihrer Substratspezifität, Geschwindigkeit und Stereospezifität zu untersuchen. Dabei sollte auch das Verständnis über die Funktionen der Aminosäuren des aktiven Zentrums erweitert werden.

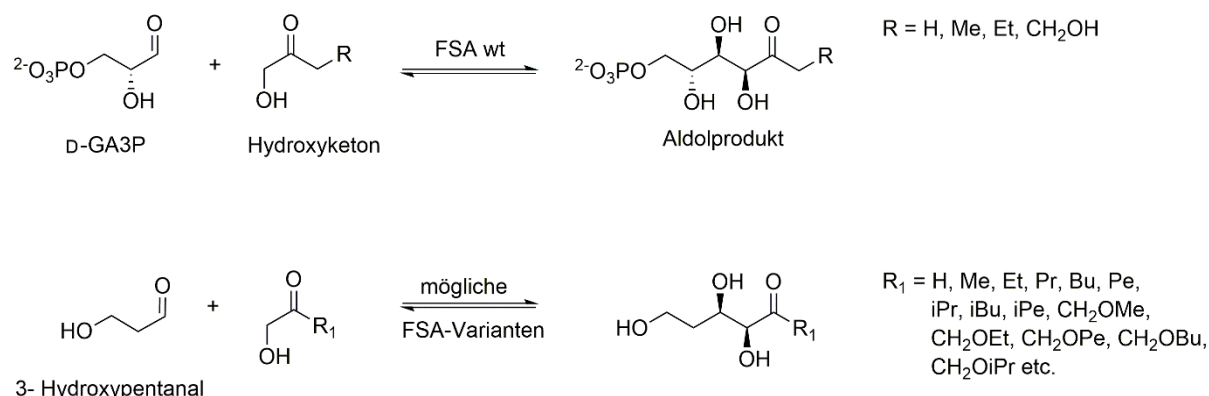
Um derartige FSA-Varianten zu erstellen, waren die Arbeiten von Clapés *et al.* wegweisend<sup>[77]</sup>. Dort wurde mithilfe eines hoch sensitiven, auf Methodol basierenden Fluoreszenzassays nachgewiesen, dass FSA wt in der Lage ist, Aceton mittels Retroaldolreaktion von einem geeigneten Substrat abzuspalten. Außerdem wurde belegt, dass die FSA-Variante D6H die Aktivität gegenüber Aceton - bei gleichzeitiger Verwendung des sehr guten Akzeptorsubstrates Glycerinaldehyd-3-phosphat - so stark steigert, dass präparative Reaktionen möglich sind (Abb. 29.)<sup>[77]</sup>.



**Abb. 29.** Literaturbekannte Reaktionen von Aceton mit D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D -GA3P) der donorerweiternden Mutationen FSA D6H<sup>[77]</sup>

Da die absolute Spezifität für hydroxylierte Ketone als Nukleophile also gebrochen und mit Glycolaldehyd auch ein Aldehyd als Donorsubstrat akzeptiert wurde, schien dieses Vorhaben sehr plausibel zu sein.

In einem zweiten Ansatz sollten mithilfe verschiedener Kooperationspartner der TU-Darmstadt und des *Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC)* FSA-Varianten erstellt werden, welche räumlich größere Hydroxyketone, wie z. B. Hydroxypentanon und Homologe als Donorsubstrat akzeptieren (Abb. 30.). Die dadurch herstellbaren multifunktionalen, chiralen Aldolprodukte könnten als Ausgangsbasis für chemisch schwer synthetisierbare Produkte dienen und somit neue Synthesewege eröffnen.



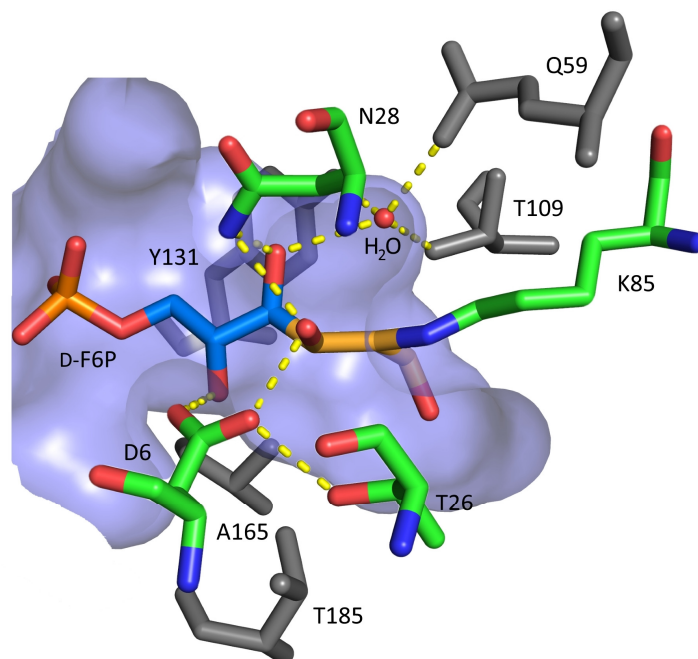
**Abb. 30.** Literaturbekannte Reaktionen von Donormolekülen mit D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D -GA3P) der FSA wt<sup>[70]</sup> sowie das Produktspektrum der in dieser Arbeit erwarteten neuen FSA-Varianten

### 3. Allgemeiner Teil

---

#### 3.1. Theoretische Überlegungen zum rationalen FSA-Design

Um die Donortoleranz der FSA für nicht hydroxylierte Substanzen zu erweitern, muss zunächst die Ursache der mangelhaften Reaktivität für diese Substrate gefunden und behoben werden. Hierfür gibt es grundsätzlich zwei Erklärungen: 1. Entweder das nicht hydroxylierte Substrat bindet nicht in dem aktiven Zentrum des Enzyms oder 2. es ist von seiner Struktur bzw. seinen funktionellen Gruppen her nicht oder nur sehr schlecht in der Lage, den für die Reaktion benötigten Übergangszustand mithilfe der vom Enzym bereitgestellten funktionellen Gruppen einzunehmen. Auf dem Weg zum Übergangszustand wird bei der FSA ein Carbanion benötigt. Dieses entsteht als Resonanzform aus dem als Enamin an K85-gebundenen Donorsubstrat mithilfe des freien N-Elektronenpaares. Das Carbanion kann die Aldehydgruppe des Akzeptorsubstrates dann nukleophil angreifen und so eine neue Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung zwischen den Substraten schaffen (Abb. 10). Für die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist die Ausbildung, Stabilität und Reaktivität des formalen Carbanions von essenzieller Bedeutung. Die Hydroxygruppe in der Nähe des Ketons kann die Elektronendichte des gebildeten Carbanions dank ihrer hohen Elektronegativität über den -I-Effekt verringern und somit stabilisieren, wodurch die Reaktivität allerdings abnimmt. Die Elektronegativität der Hydroxygruppe und somit ihr stabilisierender Einfluss ist jedoch stark von den sie umgebenden Aminosäuren abhängig<sup>[87]</sup> und kann nicht exakt vorhergesagt werden. Fehlt nun diese  $\alpha$ -Hydroxygruppe - wie z. B. bei Aceton oder Propanal - ist das Carbanion weniger stabil, aber auch reaktiver. Wird die räumliche Dichte der Elektronenwolke des Carbanions durch den Austausch von hydrophilen zu unpolaren Aminosäuren erhöht, verstärkt sich dieser Effekt. Polare Aminosäuren hingegen, die vielleicht sogar eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden können, würden die räumliche Dichte besagter Elektronenwolke vergrößern und die Stabilität des Carbanions erhöhen. Der Verlust der Hydroxygruppe kann also zu einer höheren oder verringerten Reaktionsgeschwindigkeit führen. Da es für die Reaktion auch nötig ist, dass das Akzeptorsubstrat für den nukleophilen Angriff in der richtigen Orientierung und Distanz zum Enamin vorliegt, hat die Festigkeit der Substratbindung und somit der  $K_m$ -Wert des Substrates einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Weil dieser durch die Veränderung des aktiven Zentrums ebenfalls beeinflusst wird, überlagern sich hierbei die beiden Effekte. Da es schwer ist, eine genaue Voraussage zu machen, welche Mutationen einen positiven oder negativen Effekt auf die Ausbildung des Übergangszustandes und somit auch auf den  $V_{max}$ -Wert haben und der dadurch beeinflusste  $K_m$ -Wert ebenfalls einen Effekt auf die gesamte Reaktionsgeschwindigkeit hat, ist es sinnvoller die Substratbindung beeinflussenden Aminosäuren gezielt zu verändern. Auch hier gibt es für eine schlechte Substratbindung zwei Möglichkeiten: 1. Entweder das Substrat passt aus sterischen Gründen nicht in das aktive Zentrum oder 2. seine Bindung ist aufgrund von komplementären hydrophilen/hydrophoben Substrat-Enzym-Wechselwirkungen energetisch ungünstig. Um einen detaillierten Eindruck der Ausgangssituation zu gewinnen, um die entscheidenden Aminosäurepositionen für eine Mutagenese identifizieren zu können, die nicht hydroxylierte Donorsubstrate stabilisieren könnten, wurde das aktive Zentrum der FSA virtuell begutachtet. Da es keine Kristallstruktur der FSA mit D-F6P als Substrat gibt, wurde die FSA-Röntgenstruktur (pdb 1l6w)<sup>[88]</sup> digital mit der Röntgenstruktur einer Transaldolase (pdb 3s1v)<sup>[89]</sup> überlagert. Letzteres ist ein hoch homologes Protein derselben Proteinfamilie und besitzt ein sehr ähnliches aktives Zentrum, welches mit gebundenem Substrat (D-F6P) kristallisiert wurde. Anschließend wurden die Aminosäuren der Transaldolase gelöscht, so dass ein Modell der FSA mit D-F6P im aktiven Zentrum resultierte (Abb. 31.)<sup>[47]</sup>.



**Abb. 31.** Aminosäuren im aktiven Zentrum der FSA in der Umgebung der 3-Hydroxygruppe von als Schiff'sche Base gebundenem D-F6P. Die hinter dem C3-Atom des Substrates die Kavität begrenzende Proteinoberfläche des aktiven Zentrums ist bläulich eingefärbt<sup>[75]</sup>.

In diesem Modell ist das Substrat D-F6P über eine Schiff'sche Base an K85 gebunden. Das bei dieser Reaktion entstandene Wassermolekül wird von den Aminosäuren T109, Y131 und Q59 koordiniert und steht so bei der hydrolytischen Spaltung der Schiff'schen Base zu Keton und Aminogruppe wieder zur Verfügung. Die 3- und 5-Hydroxygruppe von D-F6P sind mittels Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonsäure von D6 koordiniert. Die Amidgruppe von N28 koordiniert ebenfalls mit der 3-Hydroxygruppe, darüber hinaus jedoch auch mit der 4-Hydroxygruppe, welche sich bei der Spaltung von D-F6P in die Aldehydgruppe wandelt. Die Aminosäuren A165, T185 und T26 sind nicht direkt an der Bindung beteiligt, grenzen jedoch das aktive Zentrum um die 3-Hydroxygruppe räumlich ein und sind somit von Interesse. Darüber hinaus gibt es eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen T26 und D6, welche deren Bindung zur 3-Hydroxygruppe des D-F6P beeinflussen könnte. Aus diesem Modell wird ersichtlich, dass die mangelnde Akzeptanz von kleinen, nicht hydroxylierten Ketonen wahrscheinlich auf komplementären hydrophilen/hydrophoben Wechselwirkungen zurückzuführen sind, während bei größeren Donorsubstraten noch eine sterische Komponente eine Rolle spielt. Versucht z. B. ein Substrat ohne Hydroxygruppe, wie Aceton im aktiven Zentrum zu binden, ist dies aus sterischen Gründen zwar möglich, der aliphatische Rest hat jedoch keine Möglichkeit eine Wasserstoffbrückenbindung mit den Aminosäuren D6 und N28 einzugehen. Da dort - vor der Substratbindung - jedoch Wassermoleküle waren, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren ausgebildet hatten, würden diese Wassermoleküle verdrängt werden, ohne dabei neue Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren zu schaffen. Da die partiellen Ladungen der polaren Aminosäuren so jedoch nicht mehr ausgeglichen werden, ist dies energetisch ungünstig, weswegen es zu keiner starken Bindung von unpolaren Substanzen kommen kann. Ersetzt man jedoch die hydrophilen Aminosäuren durch hydrophobe, gibt es keine Wassermolekül-Wasserstoffbrückenbindungen, die ersetzt werden müssten. Ein Ausfüllen des hydrophoben Raumes mit z. B. einer ebenfalls hydrophoben Methylgruppe wäre sogar energetisch günstig, da die dort vorher vorhandenen Wassermoleküle außerhalb des aktiven Zentrums Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden könnten.

Für die optimale Bindung eines Substrates ist es dementsprechend nötig, die hydrophoben Aminosäuren so auszuwählen, dass dieses „eng“ um das Substrat sitzt, so dass kein Wassermolekül in den Zwischenraum passt. Nur so ist die Energiebilanz bei der Substratbindung optimal.

Möchte man nun, dass z. B. Aceton optimal bindet, wäre ein Austausch der polaren Aminosäuren gegen unpolare, etwas größere Aminosäuren, wie z. B. Leucin sinnvoll, um eine hydrophobe, sich an das Substrat anschmiegende Umgebung zu erzeugen. Soll hingegen Butanon oder Propanal/Butanal gebunden werden, ist es nötig, kleinere unpolare Aminosäuren einzusetzen (z. B. Alanin), so dass es zu keiner sterischen Hinderung kommt. Für jedes Substrat sind also andere Mutationen optimal. Da Enzyme flexible Gebilde sind, quantenmechanische Berechnungen nicht immer eine eindeutige Lösung liefern und die zur exakten Berechnung nötige Computerleistung nicht zur Verfügung stand, war es nicht möglich, vorauszusagen, welche Aminosäuren substituiert werden müssen, um eine optimale Bindung der neuen Substrate zu gewährleisten. Da verschiedene FSA-Varianten erzeugt werden müssen und eine exakte Vorhersage nicht möglich ist, bietet sich eine *CAST*-Strategie an. Entsprechend des Aufbaus des aktiven Zentrums der FSA schien es zunächst sinnvoll, die an die 3-Hydroxygruppe des Substrates bindenden Aminosäuren D6 und N28 auszutauschen. So könnte z. B. eine hydrophobe Tasche entstehen, in der die nicht hydroxylierten Substrate besser binden, was eventuell durch die Mutation von T26 verstärkt werden könnte. Damit könnte insgesamt mehr Raum für größere Ketone oder z. B. die Ethylgruppe von Propanal geschaffen werden. Da die Aminosäuren Q59, T109 und Y131 das für die Reaktion wichtige Wasser koordinieren und ein Aminosäureaustausch die Enzymaktivität wahrscheinlich empfindlich stören würde, wurde auf deren Mutagenese verzichtet. T185 und A165 wären zwar ebenfalls geeignet das aktive Zentrum für größere Substrate zu erweitern, da jedoch schon der Austausch von drei Aminosäuren eine große Anzahl an zu testenden Enzymvarianten mit sich bringt (Gleichung 2.), wurde zunächst auf deren Austausch verzichtet.

Aminosäurepositionen der FSA (A): 3

Aminosäuren je Position (B): 20

$B^A = 20^3 = 8000$  mögliche FSA-Mutanten

**Gleichung 2.** Anzahl an möglichen FSA-Varianten bei einem kombinierten Austausch von drei Aminosäuren

Um eine solch große Anzahl an Mutanten zu erzeugen, ist es unökonomisch, jede Mutante mithilfe einer *PCR*-Reaktion einzeln zu erstellen. Plausibler Weise wird für eine Sättigungsmutagenese bei der *PCR* ein sogenannter degenerierter Primer-Mix verwendet<sup>[90]</sup>. Hierbei entstehen bei der *PCR* alle gewünschten Mutationen gleichzeitig. Werden nun entsprechend kompetente Wirtszellen mit dieser DNA transformiert, können die dabei entstandenen FSA-Varianten durch das Ausplattieren auf Agarplatten in Form einzelner Kolonien voneinander getrennt und isoliert werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass man zunächst nicht weiß, welche Mutation in welcher Zelle vorhanden ist. Dies ist jedoch nicht nötig, da man alle Varianten auf ihre Aktivität für das gewünschte Substrat überprüft. Die aktiven Varianten werden dann sequenziert, um ihre Identität zu bestimmen. Bei dieser Methodik unterliegen die Mutationen jedoch einer statistischen Streuung. So ist es statistisch wahrscheinlich, dass beim Testen von 8000 zufällig ausgewählten Kolonien - bei einer Gesamtmenge von 8000 möglichen Mutanten – ohne das so genannte *oversampling* lediglich 47 % aller möglichen Mutanten vorhanden sind<sup>[91]</sup>. Aus diesem Grund ist es notwendig, mehr Kolonien zufällig auszuwählen und zu testen. Um z. B. 95 % aller möglichen Mutanten zu erstellen, wäre dann das Testen von ca. 80000 Kolonien notwendig<sup>[91]</sup>.

Um diese große Anzahl an FSA-Varianten auf ihre Aktivität für verschiedene Substrate zu untersuchen, war es nötig, einen Assay zu entwickeln, mit welchem die FSA-Bibliothek zuverlässig in hohem Durchsatz analysiert werden kann.



### 3.2. FSA-Assay-Entwicklung

Bei der Entwicklung eines solchen Assay-Systems ist es von Vorteil, wenn die Entstehung der gewünschten Produkte durch eine Farbänderung angezeigt wird, was man einen „kolorimetrischen Assay“ nennt. Dabei kann auf die Aufarbeitung und die klassisch-chemische Produktanalyse jeder einzelnen Enzymreaktion verzichtet werden, wodurch wesentlich kleinere Reaktionsansätze im Mikrolitermaßstab möglich sind. Nur so ist es ökonomisch und zeitlich möglich, eine große Anzahl an FSA-Varianten zu untersuchen. Ein solches Assay bietet darüber hinaus die Möglichkeit, nicht nur die Produktbildung durch Farbänderung zu detektieren, sondern durch die Messung der Absorption im Laufe der Zeit auch die Geschwindigkeit des Umsatzes zu messen. Dadurch ist eine zusätzliche Bewertung der Enzymvarianten möglich. Für die Entwicklung eines solchen kolorimetrischen Assays wählt man die Substrate für die Reaktion entweder so, dass aus ihnen ein farbiges Produkt entsteht, oder man koppelt eine zweite Reaktion an, die das entstandene Produkt für eine farbverändernde Reaktion verwendet. Letztere muss produktspezifisch sein und darf nicht durch Nebenreaktionen oder Verunreinigungen hervorgerufen werden. Da es nahezu unendlich viele enzymatische Reaktionen gibt, aber fast alle Enzyme mit einer Handvoll von Cosubstraten arbeiten, wurden die Farbreaktionen hauptsächlich für diese Cosubstrate zu entwickeln. So wird z. B. bei Dehydrogenaseassays in der Regel die Absorptionsänderung von NADH detektiert, welches ein universelles, substratunabhängiges Assay für diese Enzymklasse darstellt. Der große Vorteil der FSA, kein Cosubstrat zu benötigen, ist hierbei von Nachteil, da kein Universalassay für Aldolasen in der Literatur bekannt ist und für verschiedene Substrate verschiedene Assays entwickelt werden müssten. Es gibt hierfür prinzipiell zwei Möglichkeiten. Entweder das entstandene Aldolprodukt wird mit einer Farbreaktion gekoppelt (Produktassay) oder man setzt das Aldolprodukt als Substrat ein und versucht, die im Laufe der Reaktion entstehenden Retroaldolspaltprodukte zu detektieren (Spaltungsassay). Da bei Aldolreaktionen aus kleineren Fragmenten ein größeres, komplexeres Molekül entsteht, bietet dieses für ein Produktassay die Möglichkeit einer sehr spezifischen Detektion. Dies ist aber zugleich auch der Nachteil dieses Ansatzes, da es nicht immer möglich ist, eine spezifische Farbreaktion für ein neues komplexes Molekül zu finden. Wird hingegen ein komplexes Molekül in zwei einfachere Moleküle gespalten (Spaltungsassay), verdoppelt sich die Chance für eines der beiden Spaltprodukte eine koppelbare Farbreaktion zu finden. Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit höher, eine solche Reaktion bei weniger komplexen Molekülen zu finden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass bei Spaltungsassays, welche auf der Detektion eines der beiden Spaltprodukte basieren, das andere Spaltprodukt variiert werden kann, ohne die Funktion des Assays zu beeinflussen. Ein Spaltungsassay wäre also für eine Vielzahl von Reaktionen einsetzbar, während für das Produktassay bei jeder Substratänderung in der Regel eine neue Farbreaktion und somit ein neues Assaysystem gefunden werden müsste. Aus diesen Gründen wurde bei Aldolasen hauptsächlich Produktspaltungs-Assays entwickelt. Für die FSA existiert zwar in der Literatur ein Assay bei welchem D-Fructose-6-phosphat zu Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat gespalten wird<sup>[60]</sup>, da phosphorylierte Substrate jedoch nur sehr aufwendig herstellbar und von geringem synthetischen Wert sind, sollte auf diese verzichtet werden. Ein weiteres Problem bei der Assaysubstratsuche ist die Eigenschaft von 4- oder 5-Hydroxyketonen eine Ringform auszubilden. So liegt z.B. D-Fructose in wässriger Lösung nur zu ca. 0–0,7 % in einer offenkettigen Form vor<sup>[92]</sup>. Die FSA kann jedoch nur lineare Substrate binden wodurch die in Lösung vorhandene effektive Substratkonzentration erheblich sinkt. Da bei einem Assay in der Regel jedoch die 10-fache, im Idealfall sogar die 50-fache Konzentration des  $K_m$ -Wertes verwendet werden sollte<sup>[93]</sup> - um einen besseren Vergleich der  $V_{max}$ -Werte und eine kontinuierliche, von der Substratabnahme unabhängige Anfangsmessung zu gewährleisten - müsste ein solches Substrat in eine recht hohe Konzentration eingesetzt werden.

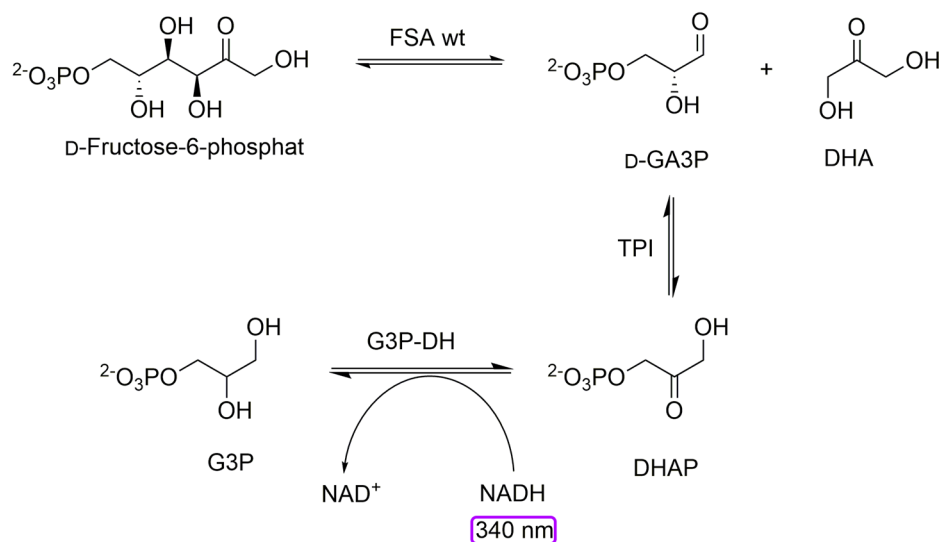
---

Zudem ist davon auszugehen, dass die neuen Assaysubstrate weniger gut binden als das namensgebende Substrat weswegen sehr viel Material verwendet werden müsste. Dies erhöht jedoch die Gefahr von Denaturierung oder Inhibition der FSA was den Assay negativ beeinflusst. Um einen Ringschluss im Aldolprodukt zu vermeiden, ist es der einfachste Weg, ein Akzeptorsubstrat zu verwenden, welches keine freie Hydroxygruppe enthält. Aus diesen Gründen bietet es sich an, eine Substanz für das Spaltungsassay zu verwenden, welches in ein simples Keton und einen simplen Aldehyd gespalten wird. Der hydrophobe Molekülanteil darf dabei nicht so groß werden, dass die Wasserlöslichkeit des Substrates zu gering wird.

Da Clapés *et al.* nachgewiesen haben, dass die FSA-Variante D6H Aceton als Donor verwenden kann<sup>[77]</sup> bot es sich an, das Assaysubstrat aus Aceton und einem einfachen Aldehyd aufzubauen. Um einen solchen, im aktiven Zentrum bindenden aliphatischen Aldehyd zu finden, wurde eine Inhibitionsstudie durchgeführt. Davon ausgehend, dass *fsa*-Mutationen an Position 6 nur die Donor-, aber nicht die Akzeptorbindung beeinflusst, wurde eine wt FSA-Kinetik mit einem D-Fructose-6-phosphat-Assay (Abb. 32.) durchgeführt. Kommt es durch den verwendeten Aldehyd zu einer kompetitiven Inhibition, bedeutet dies, dass er im aktiven Zentrum bindet und als potentiell FSA-Substrat in Frage kommt.

### 3.2.1. Inhibition der FSA durch Aldehyde und Ketone

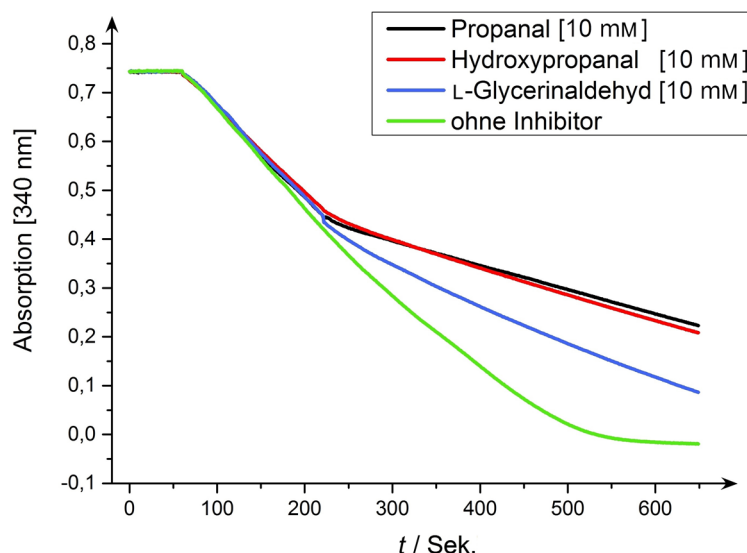
Beim D-Fructose-6-phosphat-Assay (Abb. 32.) wird D-Fructose-6-phosphat durch die FSA in Dihydroxyaceton und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat gespalten. Triosephosphatisomerase wandelt letzteres in Dihydroxyacetonphosphat um, welches von der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Glycerin-3-phosphat reduziert wird<sup>[60]</sup>. Da die Absorption von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm wesentlich stärker ist als die von  $\text{NAD}^+$ , lässt sich die D-Fructose-6-phosphat-Spaltung indirekt photometrisch verfolgen.



**Abb. 32.** D-Fructose-6-phosphat-Assay: Spaltung von D-Fructose-6-phosphat zu D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D-GA3P) und Dihydroxyaceton (DHA). Isomerisierung von D-GA3P mittels Triosephosphatisomerase (TPI) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Reduktion mittels Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (G3P-DH) zu Glycerin-3-phosphat (G3P). Detektion des Cosubstratverbrauches (NADH) bei 340 nm<sup>[60]</sup>.

Die FSA-Kinetik wurde für die ersten 60 Sekunden ohne FSA durchgeführt, um eine interne Negativkontrolle zu haben.

Anschließend wurde FSA-Lösung hinzugegeben und die Absorptionsabnahme und somit die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen. Nach 140 Sekunden wurde die Messung pausiert, Proben von verschiedene Keton- oder Aldehyd-Lösungen rasch hinzugegeben und gemischt. Danach wurde die Messung wurde für 430 Sekunden fortgesetzt (Abb. 33.).



**Abb. 33.** FSA-Kinetik mit Zugabe verschiedener Aldehyde nach 220 Sekunden

Da die Donorbindestelle des aktiven Zentrums - im Gegensatz zur Akzeptorbindestelle - sehr spezifisch ist<sup>[70]</sup>, wurden zunächst die gut bindenden Donoren Dihydroxyaceton und Hydroxyaceton mit dem schlecht bindenden Aceton und den strukturell andersartigen elektrophilen Acetoin und Pyruvat verglichen. So konnte die Aussagekraft dieser Methode bezüglich der Detektion einer möglichen Bindung verschiedener Substanzen als kompetitive Inhibitoren überprüft werden. Anschließend wurden L-Glycerinaldehyd und 3-Hydroxypropanal als bekannte Akzeptorsubstrate<sup>[47,70]</sup> mit den einfachen, aliphatischen Aldehyden Isobutyraldehyd, Propionaldehyd, Acetaldehyd und Formaldehyd verglichen (Tabelle 1.).

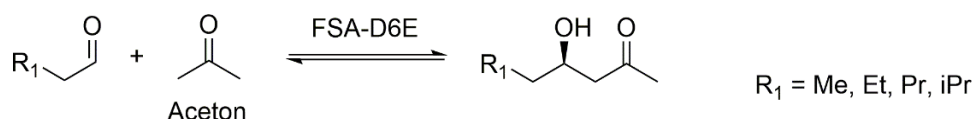
**Tabelle 1.** Einfluss verschiedener Aldehyde/Ketone auf die FSA-Aktivität

Substanz	Konzentration [mM]	Restaktivität [%], bezogen auf die Reaktion ohne Inhibitor
Acetoin	10	95
Pyruvat	10	91
Isobutyraldehyd	10	90
Aceton	40	87
L-Glycerinaldehyd	10	65
Hydroxyaceton	40	57
3-Hydroxypropanal	10	48
Dihydroxyaceton	40	47
Propanal	10	42
Formaldehyd	10	40
Acetaldehyd	10	18

Alle getesteten Aldehyde – Isobutyraldehyd ausgenommen – scheinen gut im aktiven Zentrum zu binden. Um nun herauszufinden, ob es durch die Bindung auch zu einer Produktbildung kommt, bot es sich an, verschiedene präparative Testreaktionen mit Aceton und den Aldehyden durchzuführen. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, dass D6H die beste FSA-Variante für Aceton war, wurde die ebenfalls in der Gruppe von Clapés *et al.* entwickelte FSA D6E-Variante verwendet.

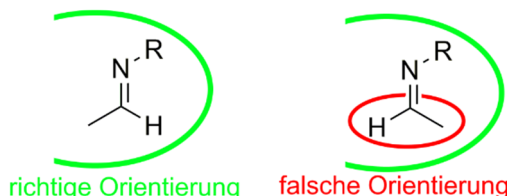
### 3.2.2. Präparative Reaktion von FSA D6E mit Aceton und verschiedenen Aldehyden

Da in der Literatur aufgrund des angenommenen geringen  $K_m$ -Wertes große Mengen Aceton (20 % v/v)<sup>[77]</sup> verwendet wurden und Aldehyde ebenfalls denaturierend auf Enzyme wirken können, war es sinnvoll, bei der präparativen Synthese ganze Zellen, in welchen *fsa* D6E<sup>[94]</sup> exprimiert worden ist, zu verwenden. Diese bieten einen natürlichen Schutz der Enzyme vor denaturierenden Effekten und sowohl Zellwand als auch Zellmembran dürften für die eingesetzten kleinen Substrate und für das Produkt vollständig permeabel sein<sup>[95]</sup>. Darüber hinaus lassen sich Zellen durch Zentrifugation leicht entfernen, was die Aufreinigung erleichtert. Als Puffer wurde zweifachkonzentrierter *PBS* verwendet, um durch den physiologischen osmotischen Druck das Platzen der Zellen zu verhindern. Es konnten so die Produkte von Aceton mit Propionaldehyd, Butyraldehyd, Valeraldehyd und Isovaleraldehyd isoliert und charakterisiert werden.



**Abb. 34.** Präparative, mittels FSA D6E in ganzen Zellen, katalysierte Reaktionen von Aceton mit verschiedenen Aldehyden

Während Formaldehyd aufgrund seiner Struktur nicht in der Lage ist, das für die FSA-Katalyse relevante Enamin auszubilden, war Acetaldehyd bei der verwendeten Konzentrationen über einen längeren Zeitraum eventuell zu stark denaturierend. Auch könnte es sein, dass Acetaldehyd wegen seiner geringen Größe und Polarität mit K85 eine Schiff-Base in invertierter Orientierung bildet und dadurch das katalytische Zentrum blockiert (Abb. 35.).



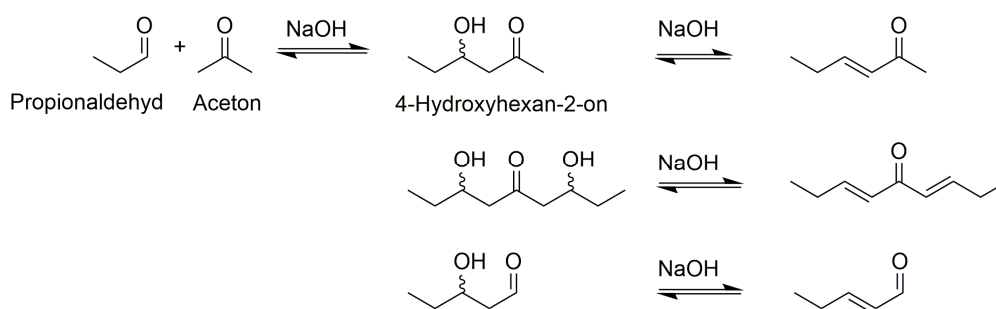
**Abb. 35.** Richtig vs in falscher Orientierung gebundener Acetaldehyd im aktiven Zentrum der FSA (grün)

Da Propanal sehr gut im aktiven Zentrum der FSA bindet und von FSA D6E mit Aceton zu 4-Hydroxyhexan-2-on umgesetzt werden kann, scheint es als Assaysubstrat gut geeignet zu sein.

### 3.2.3. Synthese des Assaysubstrates 4-Hydroxyhexan-2-on

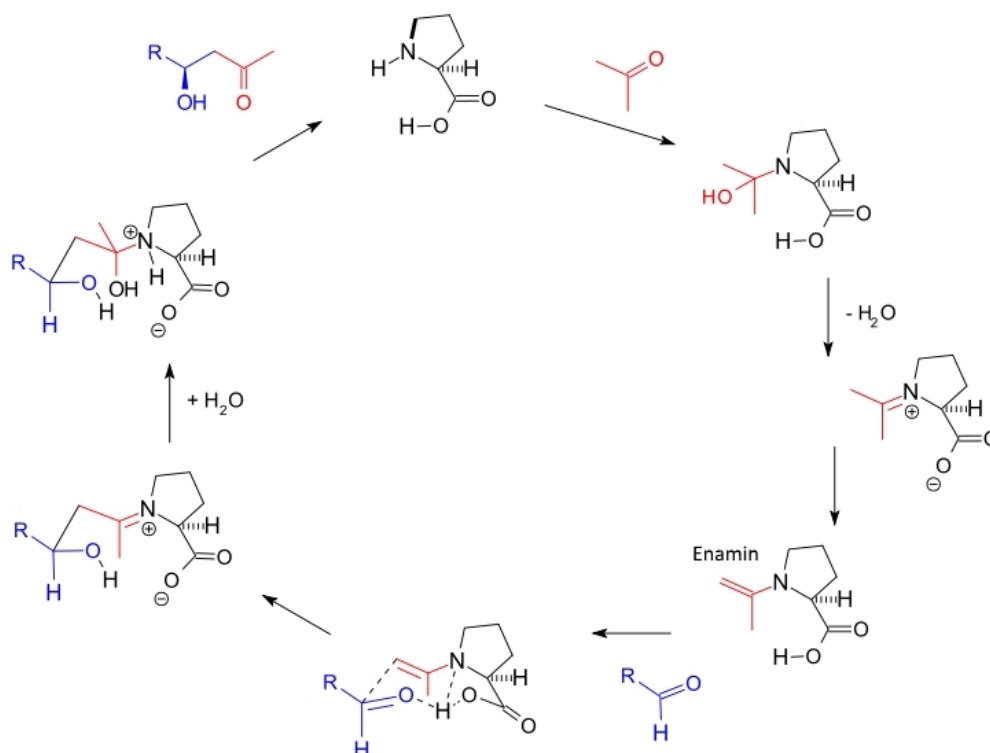
Um 4-Hydroxyhexan-2-on im für Reihenversuche benötigten Gramm-Maßstab herzustellen, gab es verschiedene Alternativen. Hinsichtlich der besseren Skalierbarkeit bot sich zunächst das chemische Pendant zur enzymatischen Synthese für die Aldolreaktion aus Aceton und Propionaldehyd an.

Dazu wurden zunächst Aceton und Propionaldehyd in stark verdünnter Natronlauge (2,5 mM) gelöst. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Aldehyd frisch destilliert ist, um eine Neutralisation der Natronlauge von - durch Autooxidation entstandener - Propansäure zu verhindern<sup>[96]</sup>. Die Natronlauge sollte ein acids  $\alpha$ -ständiges Wasserstoffatoms der Methylgruppe des Acetons abstrahieren. Das so entstandene mesomeriestabilisierte Carbanion/Enolat kann die Aldehydgruppe von Propanal nukleophil angreifen. Nach Neutralisation sollte so das gewünschte Aldolprodukt entstehen. Da nach 24 Stunden Reaktionszeit mittels dünnschichtchromatographischer Analyse keine Produktbildung beobachtet werden konnte, wurde die Konzentration an Natronlauge auf 8,5 mM erhöht. Nach weiteren 24 Stunden konnte jedoch nur unselektive Produktbildung beobachtet werden. Wahrscheinlich kam es zu Propanal-Homoaldoladditionen, zu doppelten Aldoladdition am Aceton sowie, auch bedingt durch den höheren pH-Wert, zu Eliminierungsprodukten (Abb. 36). Auch wäre eine Aceton-Aceton Kondensation möglich. Aufgrund der Vielzahl neuer Verbindungen, wurde auf eine Aufreinigung verzichtet.



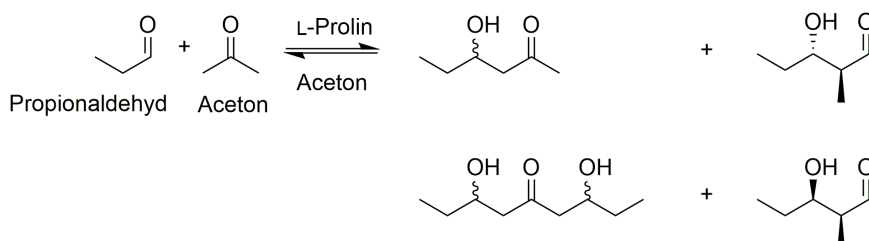
**Abb. 36.** Durch mit Natronlauge katalysierte Aldolreaktion von Propionaldehyd und Aceton mit möglichen Nebenprodukten

Eine weitere Möglichkeit bestand in der L-Prolin-katalysierten Hajos–Parrish–Eder–Sauer–Wiechert-Reaktion (Abb. 37.)<sup>[97,98]</sup>. Da das zwitterionische Prolin dabei eher als Nukleophil denn als Base fungiert, war davon auszugehen, dass es nur wenige oder sogar keine Eliminierungsreaktionen geben könnte. Mechanistisch kommt es zu einem nukleophilen Angriff der Aminogruppe des Prolins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Acetons. Durch die räumliche Nähe der intramolekularen Säuregruppe wird die entstandene Hydroxygruppe des Halbaminals protoniert und Wasser wird abgespalten. Durch eine Protonenübertragung von einer Aceton-Methylgruppe kommt es zum Ladungsausgleich und zur Bildung eines Enamins. Dieses ist in der Lage einen nukleophilen Angriff auf das Kohlenstoffatom einer Aldehydgruppe durchzuführen, wobei die Säuregruppe über einen sechsgliedrigen Übergangszustand intramolekular stabilisiert und katalysiert. Dadurch wird eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verbindung zwischen der zum Enamin umgewandelten ehemaligen Methylgruppe des Acetons und der Aldehydgruppe ausgebildet. Durch anschließende Hydrolyse wird das gesuchte Aldolprodukt vom Prolinkatalysator gelöst. Um Mehrfachadditionen zwischen Aceton mit Propanal zu verhindern, wurde Aceton als Lösungsmittel verwendet.



**Abb. 37.** L-Prolin katalysierte Aldolreaktion von Aceton mit Aldehyden

Durch Verwenden von L-Prolin als Katalysator wurden Eliminierungsreaktionen eventuell zwar unterdrückt, die große Anzahl an neu gebildeten Produkten verhinderte jedoch auch hier ein effektives Aufarbeiten. Es war davon auszugehen, dass neben Multi-Homoaldolprodukten aus Propionaldehyd<sup>[99]</sup> auch die doppelte Aldoladdition an Aceton stattgefunden hatte (Abb. 38.).



**Abb. 38.** Mit L-Prolin katalysierte Aldolreaktion von Propionaldehyd und Aceton mit möglichen Nebenprodukten

Eine weitere Möglichkeit bot sich in der Aldolreaktion mit Lithiumdiisopropylamid. Dabei wird Aceton bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  in THF vorgelegt. Das Aceton wird aufgrund der niedrigen Temperatur und der in stöchiometrischer Menge vorliegenden starken Base vollständig und praktisch irreversibel zum Enolat deprotoniert. Durch Überführung in das Enolat ist der Carbonylkohlenstoff nicht mehr elektrophil, so dass eine Homoaldolreaktion zwischen Acetonmolekülen ausgeschlossen wird. Nun wurde langsam Propionaldehyd hinzugegeben. Dadurch liegt Propionaldehyd immer im Unterschuss gegenüber dem Aceton-Enolat vor, so dass eine Homoaldolreaktion des Propanals ebenfalls weitgehend ausgeschlossen wird. Aufgrund der basischen Bedingungen liegt das Aldolprodukt zunächst als Alkoholat vor, so dass eine Mehrfachaldoladdition ebenfalls nicht stattfinden kann. Da Lithiumdiisopropylamid zudem eine sterisch gehinderte Base ist, kann sie nur sehr schlecht Protonen von sekundären oder tertiären Kohlenstoffatomen abstrahieren, so dass Eliminierungsreaktionen effektiv verhindert werden.

Nach Quenchen der Reaktionsmischung und destillativer Aufarbeitung waren jedoch zwei verschiedene chemisch und physikalisch sehr ähnliche Produkte entstanden, von denen eins das gewünschte 4-Hydroxyhexan-2-on war. Der Versuch ihrer Trennung war mit größeren Aufbereitungsverlusten verbunden, so dass diese Methode der Substratherstellung - auch wegen ihrer eher komplexen Versuchsdurchführung - verworfen wurde.

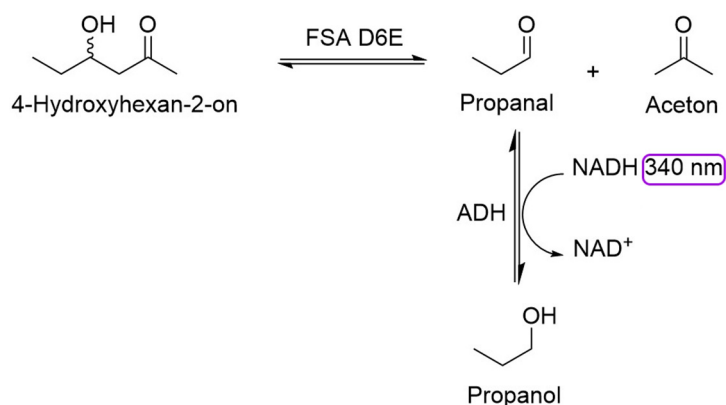
In einem anderen Experiment wurde Aceton mit methanolischer Kalilauge basisch gemacht und kontinuierlich - von mit Propionaldehyd angereichertem Argongas – durchperlt<sup>[100]</sup>. Durch anschließendes Ausfällen der Natronlauge mit Oxalsäure und Evaporation von überschüssigem Aceton ließ sich mit dieser Methode 4-Hydroxyhexan-2-on zusammen mit dem nicht abtrennbaren Aceton-Homoaldolprodukt 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on (Verhältnis 1:1) auf einfachem Weg in großen Mengen herstellen (10 g und mehr). Das Aceton-Homoaldolprodukt sollte in einem FSA-Assay jedoch nicht stören, da es aufgrund des quartären Kohlenstoffatoms an Position 4 nicht im aktiven Zentrum binden kann.

Natürlich war es auch möglich, die FSA-Variante D6E zu verwenden, um das Screeningsubstrat herzustellen. Dafür wurde eine wässrige FSA-Lösung mit Aceton und Propionaldehyd versetzt. Um die schlechte Bindung von Aceton zu kompensieren, wurde es in molarer Konzentration verwendet. Nach Reaktionsende wurde das Protein mit Ethanol in der Kälte gefällt und durch Zentrifugation entfernt. Aus der nach Aufkonzentration zurückbleibenden orangenen zähen Masse konnte das Produkt zwar durch Extraktion mit Aceton gewonnen werden, die Ausbeute war trotz guter Reinheit jedoch nur gering. Das Produkt ließ sich so nur im mg-Maßstab herstellen.

Nachdem verschiedene Methoden zur Herstellung des Screeningsubstrates 4-Hydroxyhexan-2-on getestet und evaluiert worden waren, wurde sowohl die Gasstrommethode als auch die enzymatische Methode mittels FSA D6E zur Herstellung von 4-Hydroxyhexan-2-on als Substrat für die verschiedenen Assays verwendet.

### 3.2.4. Alkohol-Dehydrogenase-Assay

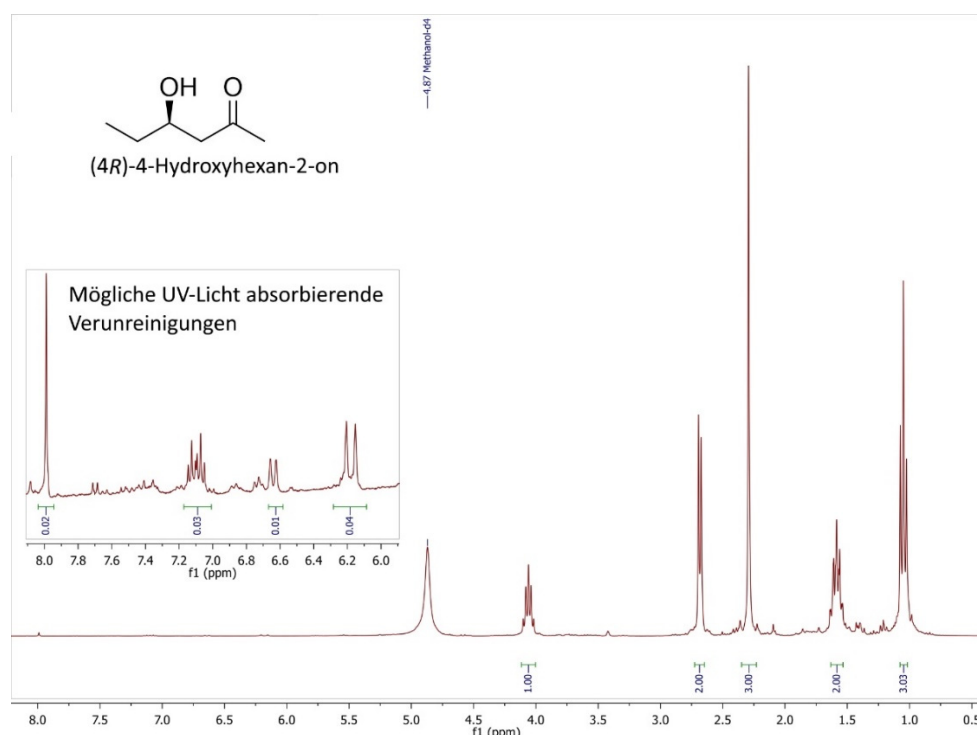
Um einen Spaltungsassay mit 4-Hydroxyhexan-2-on zu etablieren, bot es sich an, den bei der Spaltung entstehenden Propionaldehyd mittels Alkoholdehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu reduzieren und die Abnahme der Absorption bei 340 nm zu detektieren (Abb. 39.). Dies ist ein weit verbreitetes Assay; die aus *Saccharomyces cerevisiae* stammende Alkoholdehydrogenase ist kommerziell günstig zu erwerben, hat eine hohe spezifische Aktivität (300 U/mg) und die NADH-Abnahme kann entweder direkt oder über gekoppelte Farbreaktionen gemessen werden.



**Abb. 39.** NADH-Assay: 4-Hydroxyhexan-2-on wird von FSA D6E in Aceton und Propanal gespalten. Propanal wird von der Alkoholdehydrogenase (ADH) unter NADH-Verbrauch reduziert. Die Abnahme der NADH Konzentration wird bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert.



Um diese Methode auf ihre Tauglichkeit für das 4-Hydroxyhexan-2-on-Assay zu testen, wurde eine Testreaktion mit FSA D6E, Alkoholdehydrogenase und NADH durchgeführt. Die Absorption der Lösung wurde für 60 Sekunden bei 340 nm als interne Negativkontrolle gemessen. Nach Zugabe von, mittels D6E hergestellten 4-Hydroxyhexan-2-on (65 mM) stieg die Absorption sofort bis zur Detektionsgrenze des Gerätes an. Auch eine Wiederholung mit geringer Konzentration von 4-Hydroxyhexan-2-on (10 mM) sowie dessen Reinigung mittels Filtration durch einer Aktivkohle brachte keine Verbesserung. Die Kontrolle des  $^1\text{H}$ -NMRs von - mittels FSA D6E - hergestelltem 4-Hydroxyhexan-2-ons zeigte in der Vergrößerung mehrere Signale im aromatischen/olefinischen Bereich (Abb. 40.). Anscheinend war bei der enzymatischen Synthese in geringen Mengen ein Farbstoff entstanden, der im UV-Bereich stark absorbierte und eine photometrische Verwendung der Probe verhinderte. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Aldol-Kondensationsprodukt. Hinsichtlich der geringen Ausbeute dieser Reaktion war eine Destillation als weiterer Reinigungsschritt nicht praktikabel.



**Abb. 40.**  $^1\text{H}$ -NMR von mit FSA D6E hergestelltem (4R)-4-Hydroxyhexan-2-on und vergrößertem aromatischen Signalbereich.

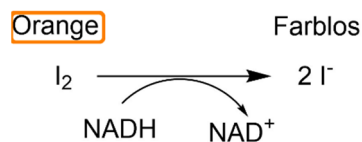
Das Verwenden von - mittels Gasstrommethode hergestelltem - 4-Hydroxyhexan-2-on schien diesen Nachteil nicht zu besitzen; die Absorption blieb innerhalb des Detektionsbereiches. Tatsächlich konnte über die Zeit eine deutliche Abnahme der Absorption beobachtet werden. Eine Negativkontrolle bei welcher FSA D6E durch die - aus der Arbeitsgruppe von Clapés erhaltene - inaktive FSA K85M ersetzt worden war, zeigte jedoch eine vergleichbare Absorptionsabnahme über die Zeit. Die Positivkontrolle mit Propanal zeigte dass die Reaktion prinzipiell richtig abläuft. Dieses Assaysystem schien also ungeeignet. Wahrscheinlich ist die Instabilität des Substrates hierfür verantwortlich, welches durch spontane Retro-Aldol-Reaktion und allgemeine Basenkatalyse in Wasser Propanal freisetzt, welches detektiert wurde. Eine Wiederholung des Experimentes mit Zelllysats aus 96-Well-Platten, welche später für das *high-throughput-screening* verwendet werden sollten, zeigte darüber hinaus die Anfälligkeit der Messung gegenüber kleinen Partikeln. Diese können eine temporär starke Absorption im UV Bereich verursachen und stören so die Auswertbarkeit der Messung. Da 96-Well-Platten jedoch nur mit einer begrenzten *g*-Kraft zentrifugiert werden können, welche das Auftreten solcher



kleinen Partikel nicht gänzlich ausschließen kann, schien ein solches Assay ungeeignet, insbesondere da ein Hochdurchsatzscreening eine gewisse Robustheit der Methode aufweisen sollte, um eine Vielzahl von Wiederholungsexperimenten zu verhindern. Ein weiteres Problem von auf Absorptionsänderung im UV-Bereich basierenden Assays ist die Fehlersuche. Da der Mensch keine „Farbveränderung“ im UV-Bereich sehen kann, arbeitet er „blind“ und ist auf die Messwerte eines Spektrometers angewiesen. Absorptionsänderungen vor der Messung, z. B. durch das Hinzufügen einzelner Assaykomponenten oder Messwertverfälschungen z. B. durch Verunreinigungen oder Partikel lassen sich so schwer und nur mit hohem Aufwand untersuchen. Aus diesen Gründen bot es sich an, auf ein farbbasiertes Assaysystem zu wechseln.

### 3.2.5. Jod-Assay

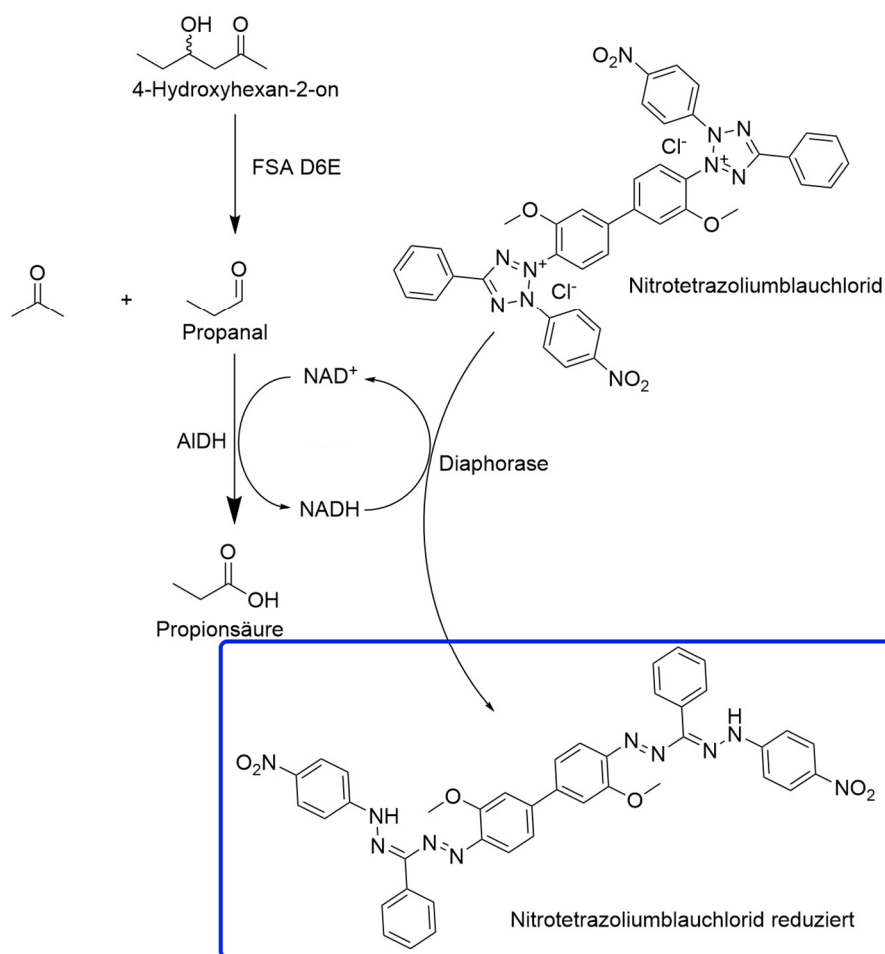
Um ein Assayverfahren im sichtbaren Absorptionsbereich zu testen, wurde Jod in Triethanolamin-Puffer (TEA-Puffer) gelöst, was eine Orangefärbung der Lösung zur Folge hatte. Nun wurde NADH hinzugegeben, welches das Jod zu Jodid reduziert (Abb. 41.). Dabei verschwand die Orangefärbung. Ein Kontrollexperiment mit FSA ohne NADH zeigt jedoch ebenfalls ein Verschwinden der Färbung, so dass der Versuch als Assaysystem nicht geeignet scheint.



**Abb. 41.** Jod-Assay: Reduktion von Jod durch NADH

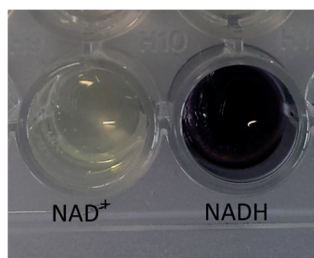
### 3.2.6. Nitrotetrazoliumblauchlorid-Assay

Eine weitere Möglichkeit, eine  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ -Reaktion visuell zu verfolgen, bietet der Farbstoff Nitrotetrazoliumblau (NBT)<sup>[101]</sup>. NBT ist in seiner oxidierten Form farblos und wird durch Reduktion über eine rote Zwischenstufe (Mono-Formazanfarbstoff) in einen blauen Diformazan-Farbstoff umgewandelt. Der Elektronentransfer wird dabei von dem flavinmononucleotidhaltigen Enzym Diaphorase katalysiert. Diese Enzymart ist in der Lage, Farbstoffe durch Oxidation von Pyridinnukleotiden wie NADH zu reduzieren<sup>[102]</sup>. Da hierbei die Assayreaktion kein NADH verbraucht sondern produziert, kam eine Aldehyddehydrogenase zum Einsatz, welche Propionaldehyd unter  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch zu Propionsäure oxidiert. Das dabei entstehende NADH kann dann zur Reduktion von NBT verwendet werden (Abb. 42.). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass das Deprotonieren der entstehenden Propionsäure - bei leicht basischem pH-Wert - das Gleichgewicht der Reaktion quasi irreversibel auf die Seite der Substratspaltung verschiebt. Das Gen der Aldehyddehydrogenase aus *Escherichia coli* wurde freundlicherweise von Dr. Park zur Verfügung gestellt<sup>[36]</sup>; die Aldehyddehydrogenase wurde nach Literaturvorschrift präpariert. Die hat den Vorteil, eine große Anzahl an aliphatischen Aldehyden als Substrat zu akzeptieren, was eine eventuelle spätere Veränderung des Assays möglich machen sollte. So könnten nicht nur Propanal abspaltende Screeningsubstrate, sondern auch z. B. Isovaleraldehyd, Benzaldehyd als Spaltprodukte nachgewiesen werden<sup>[36]</sup>, was eine breite Verwendung des Assays ermöglichen würde.



**Abb. 42.** NBT-Assay: 4-Hydroxyhexan-2-on wird von FSA D6E zu Aceton und Propanal gespalten. Letzteres wird von der Aldehyddehydrogenase (AIDH) zu Propionsäure oxidiert. Die Elektronen werden auf  $\text{NAD}^+$  und von dort mithilfe der Diaphorase weiter auf NBT übertragen, welches sich blau färbt. NADH wird so regeneriert.

Um den Assay zu evaluieren, wurde Nitroblautetrazoliumchlorid-Lösung mit Diaphorase und entweder NADH- oder NAD<sup>+</sup>-Lösung versetzt. Bei NADH-Zugabe erfolgte sofort eine tiefe Violettfärbung, die Lösung mit NAD<sup>+</sup> blieb farblos (Abb. 43.). Ohne Zugabe von Diaphorase blieben beide Proben länger als 10 Min. farblos.



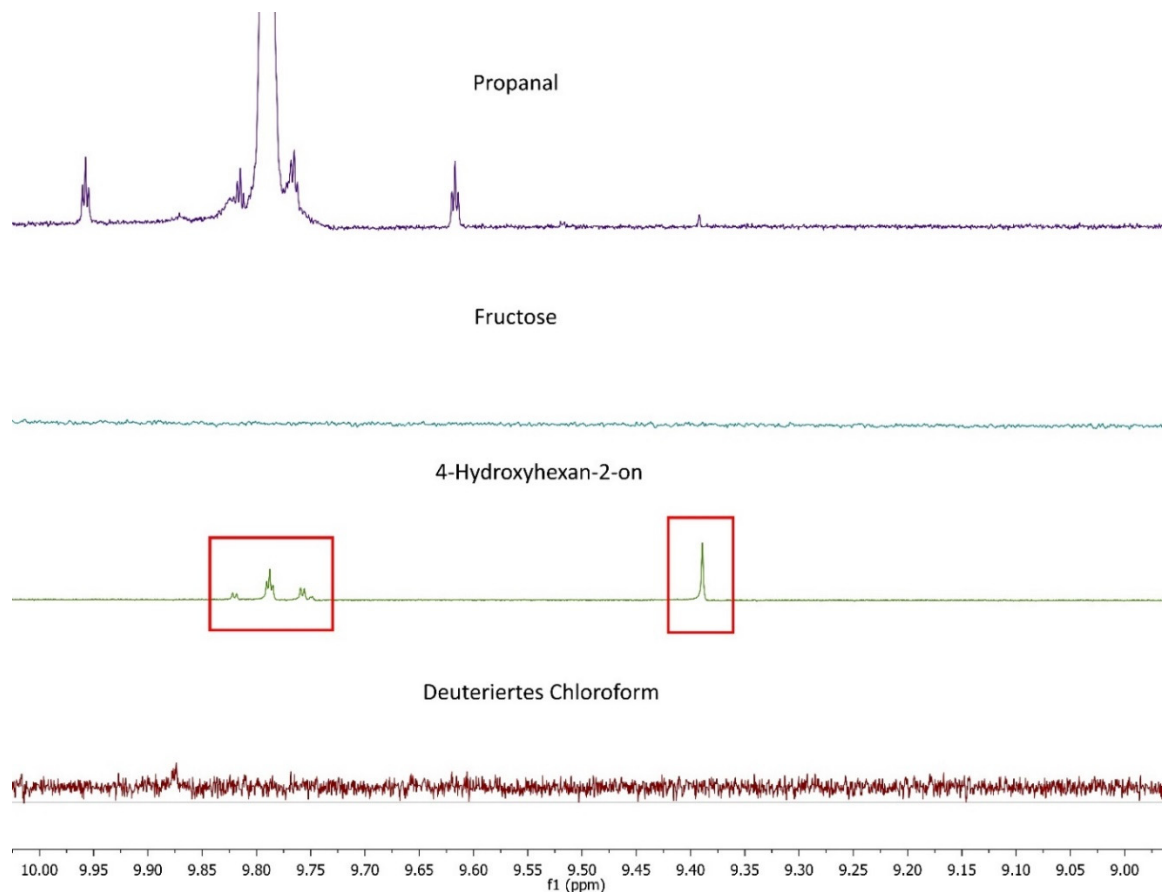
**Abb. 43.** NBT mit NAD<sup>+</sup> (0,25 mM) und NADH (0,25 mM) in einer 96-Well-Platte

Von der so reduzierten NBT-Lösung (0,5 mM) wurde ein Absorptionsspektrum gemessen, um die optimale Wellenlänge für die Detektion des Farbumschlages zu ermitteln (540 nm gefunden). Dieser Wert stimmt mit den Literaturangaben (350-650 nm) überein<sup>[103]</sup>. Da das Assaysystem passend schien, wurde eine Testreaktion mit NBT-Pufferlösung, Diaphorase, NAD<sup>+</sup> und 4-Hydroxyhexan-2-on angesetzt. Bevor FSA D6E hinzugegeben werden konnte, kam es jedoch bereits zu einer Violettfärbung der Lösung. Um diesen unerwarteten Effekt näher zu untersuchen, wurde das Experiment mit verschiedenen Substraten wiederholt. Neben dem eigentlichen Assaysubstrat 4-Hydroxyhexan-2-on wurde das zu erwartende Spaltprodukt Aceton, der oxidierbare Alkohol *Sec*-Butanol sowie Fructose als Molekül mit verschiedenen Funktionellen Gruppen getestet. Außer bei 4-Hydroxyhexan-2-on kam es zu keiner Färbung der Lösung (Tabelle 2).

**Tabelle 2.** Verfärbung von NBT durch verschiedene Substanzen

Substrat	Konzentration [mM]	Verfärbung von NBT
4-Hydroxyhexan-2-on	100	Ja
Aceton	700	Nein
<i>Sec</i> -Butanol	700	Nein
Fructose	700	Nein

Da eine solche Farbänderung spezifisch für 4-Hydroxyhexan-2-on erfolgte, ohne dass es zur Aldehydabspaltung durch FSA kommen konnte, wurden 4-Hydroxyhexan-2-on mit dem nicht assayauslösendem Substrat Fructose und dem möglicherweise vorkommenden Aldehyd Propanal NMR-spektroskopisch untersucht. Da 4-Hydroxyhexan-2-on möglicherweise im Laufe der Zeit einer Retroaldoladdition unterliegt, wurde es vor der Untersuchung im Vakuum frisch destilliert. Um eine bessere Nachweisgrenze zu erreichen, wurde die Anzahl der NMR-Scans des Protonen-Spektrums auf 64 erhöht; es wurden jeweils 50 mg Substanz eingesetzt. Das NMR-Lösungsmittel der Messung von 4-Hydroxyhexan-2-on und Propanal sowie deuteriertes Chloroform wurde als Referenz mitvermessen. Die Messung von Fructose fand aus Löslichkeitsgründen in D<sub>2</sub>O statt. Zur Analyse wurde der Spektrenbereich von 9,0 – 10,0 ppm stark vergrößert betrachtet (Abb. 44.).

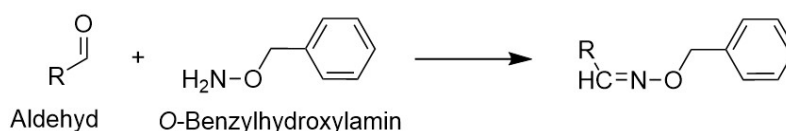


**Abb. 44.** Vergleich der NMR-Spektren von Fructose, 4-Hydroxyhexan-2-on und Propanal im Aldehydbereich

Während Fructose frei von Aldehydspuren war, schien der mittels Signalintegration ermittelte Anteil an Aldehyd in der Probe mit 4-Hydroxyhexan-2-on ca. 3 % zu betragen. Aufgrund der Signalverschiebung scheint es sich wahrscheinlich um Propanal (9.75-9.85 ppm) und möglicherweise um einen weiteren Aldehyden (9.39 ppm) zu handeln. Da es in Assays mit nicht natürlichen Substraten notwendig ist, eine höhere Substratkonzentration einzusetzen, um den zu erwartenden geringen  $K_m$ -Wert auszugleichen, scheinen bereits kleine Aldehydverunreinigungen auszureichen, um genug NADH für ein falsch positives Signal zu produzieren. Aus diesen Gründen war es sinnvoll, diese Aldehydspuren im Substrat selektiv zu entfernen.

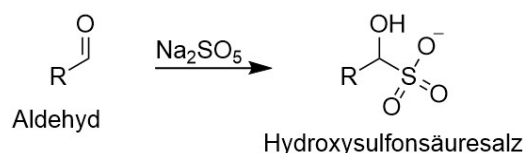
### 3.2.7. Eliminierung von Aldehydspuren in 4-Hydroxyhexan-2-on

Da weder Destillation noch das Anlegen von Unterdruck eine hinreichende Entfernung der Aldehydspuren in 4-Hydroxyhexan-2-on ermöglichte und die säulenchromatographische Aufreinigung bei den benötigten Mengen unpraktikabel war, wurde zunächst nach chemischen Wegen gesucht, die Verunreinigung zu entfernen. Auch wurde so die Gefahr einer durch das Säulenmaterial katalysierten Retroaldolspaltung umgangen. Zunächst wurde dazu in eine D<sub>2</sub>O-Lösung von 4-Hydroxyhexanon das 20-fache der berechneten Aldehydmenge an *O*-Benzylhydroxylamin gegeben, um den Aldehyd selektiv in Gegenwart des Ketonsubstrats in ein Oxim zu überführen (Abb. 45.)<sup>[104]</sup>.



**Abb. 45.** Quenching von Aldehydspuren mit *O*-Benzylhydroxylamin

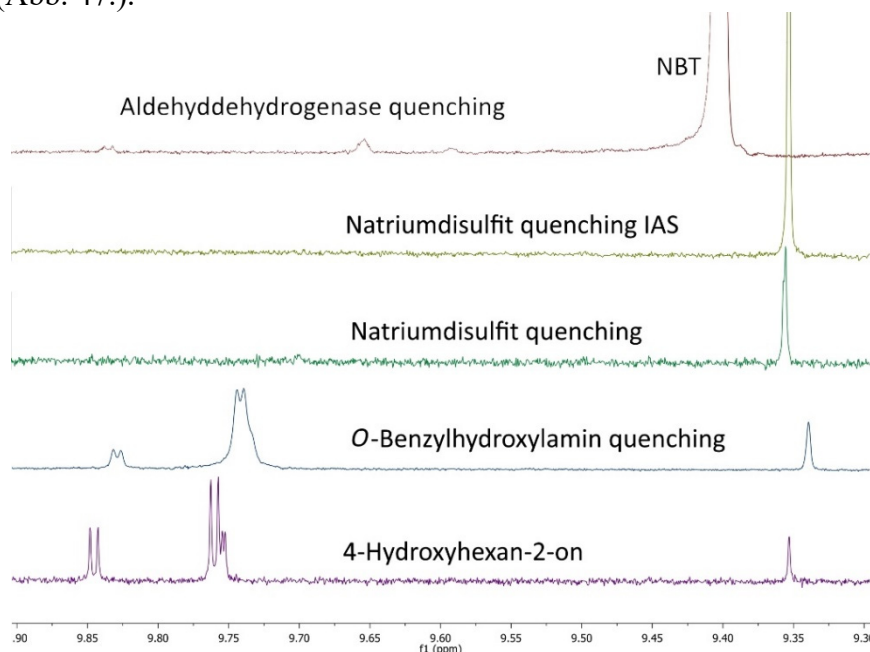
Nach einer Stunde bei 37 °C wurde das Oxim durch eine Cyclohexan/D<sub>2</sub>O Extraktion entfernt. Die wässrige Lösung wurde mittels NMR auf Aldehydspuren untersucht. Diese waren aber nicht vollständig entfernt worden. Auch eine Wiederholung in - mit D<sub>2</sub>O stark verdünnter - Natronlauge zur Beschleunigung der Oximbildung zeigte keine vollständige Entfernung der Aldehyde (Abb. 47.). Eine weitere Möglichkeit bestand in der Reaktion von Aldehyden mit Natriumdisulfit<sup>[105]</sup>. Dabei wird der Aldehyd in eine Hydroxysulfonsäuresalz-Verbindung überführt (Abb. 46.). Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der langsamen Hydrolyse des Disulfitsalzes zu Natriumhydrogensulfit. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die so entstandenen Verbindungen geladen sind und mittels Ionenaustauscher aus der Substratlösung einfach entfernt werden können.



**Abb. 46.** Quenching von Aldehydspuren mit Natriumdisulfit

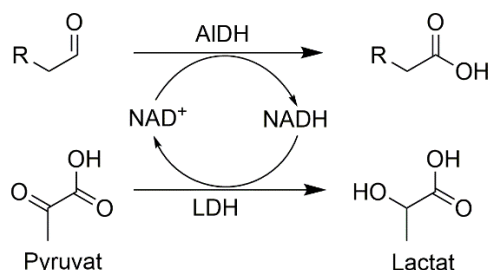
Um dies zu untersuchen, wurde zu einer Lösung von 4-Hydroxyhexan-2-on in D<sub>2</sub>O die 10-fache Masse an Natriumdisulfit bezüglich der berechneten Aldehydmenge hinzugegeben. Nach einer Stunde bei 37 °C wurde ein NMR angefertigt. Das Propionaldehyd-ähnliche Signal war verschwunden; es gab jedoch keinerlei Auswirkung auf das Signal bei 9.35 ppm (Abb. 47.). Darüber hinaus waren verschiedene neue Signale zwischen 5.4 und 7.4 ppm entstanden. Da diese ein größeres Integral als die Aldehydspuren hatten, war das Disulfit vermutlich Nebenreaktionen mit 4-Hydroxyhexan-2-on eingegangen. Um diese Nebenprodukte - wahrscheinlich Sulfonsäuresalzverbindungen - aus der Lösung zu entfernen, wurde mit basischem Ionenaustauscher versetzt und gerührt. Der Überstand wurde per NMR analysiert. Die Aldehydsignale waren vollständig verschwunden; die Gesamtsignalintensität hatte jedoch um ca. 50 % abgenommen. Wahrscheinlich kam es zu Adsorption an dem Säulenmaterial. Der Versuch wurde wiederholt, die Lösung wurde jedoch über eine kleine Säule mit basischem Ionenaustauscher gefiltert, um die Kontaktzeit und damit die Adsorption zu verringern. Das angefertigte NMR war frei von Nebenproduktsignalen, die Aldehydsignale waren verringert, jedoch noch vorhanden. Es ist davon auszugehen, dass Natriumdisulfit aufgrund seiner Reaktivität nicht in der Lage ist, alle Aldehydspuren selektiv zu entfernen, ohne zu stark mit dem fast 100-fach höher konzentrierten 4-Hydroxyhexan-2-on zu reagieren.

Eine weitere Möglichkeit, diese Aldehydspuren zu entfernen, bestand darin, die Aldehyddehydrogenase für eine vollständige Oxidation zu verwenden. Dafür wurde in - mit  $D_2O$  hergestelltem - TEA-Puffer 4-Hydroxyhexan-2-on mit NBT, Diaphorase, Aldehyddehydrogenase und  $NAD^+$  gelöst. Nach einer Stunde wurde die Lösung per NMR analysiert. Alle Aldehydspuren waren verschwunden, die 4-Hydroxyhexan-2-on-Konzentration hatte war unverändert, die zusätzlichen Signale im aromatischen Bereich waren dem NBT zuzuordnen (Abb. 47.).



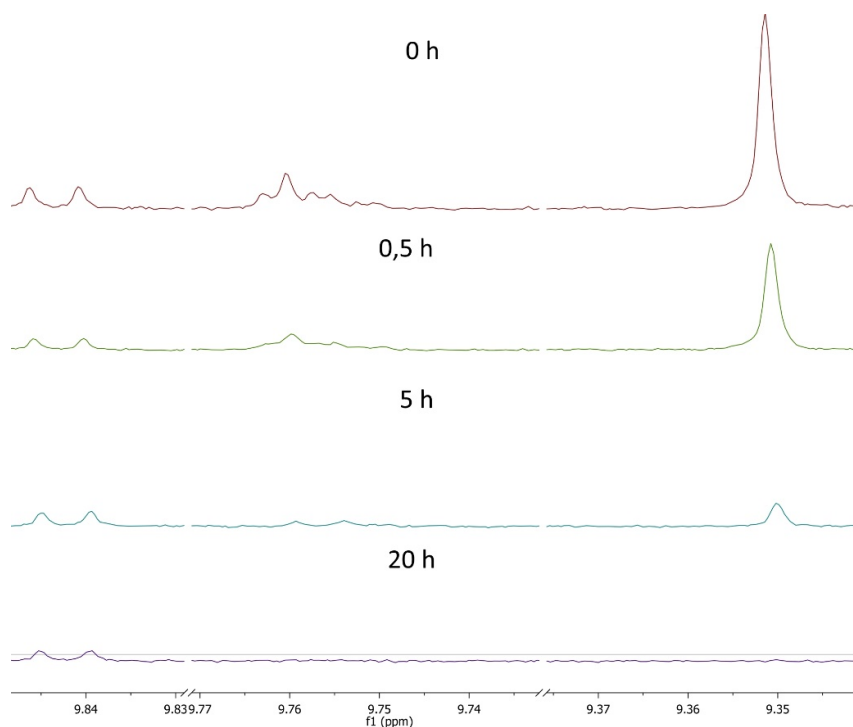
**Abb. 47.** NMR-Nachweis von Aldehydspuren in 4-Hydroxyhexan-2-on nach verschiedenen Methoden zur Beseitigung derselben. IAS= Ionenaustauschchromatographie

Da die Verwendung der Aldehyddehydrogenase die einzige Möglichkeit darstellte, die Aldehydspuren komplett zu entfernen, bot sich eine Vorbehandlung der Substratlösung an, so dass diese keinen assaystörenden Aldehyd mehr enthält. Da bei diesem Vorgang NADH produziert wird, welches NBT reduziert und somit ein falsch positives Signal entsteht, musste das  $NAD^+$  ebenfalls regeneriert werden. Darum wurden die Elektronen des entstandenen NADH mittels Lactat-Dehydrogenase auf Pyruvat übertragen (Abb. 48.). Um das Gleichgewicht der Reaktion auf die  $NAD^+$ -produzierende Seite zu verschieben, wurde ein Überschuss an Pyruvat verwendet. Nachdem alle Aldehydspuren oxidiert und  $NAD^+$  regeneriert waren, mussten die Enzyme mittels Membranfiltration aus der Lösung entfernt werden. Dadurch wird verhindert, dass später während der Assaymessung das entstandene NADH ebenfalls verbraucht wird und somit nicht mehr für eine Färbung des NBT zu Verfügung steht. Da sowohl die Diaphorase als auch die Aldehyddehydrogenase Kaliumionen als Cofaktor brauchen, wurde für diese Reaktionen Kaliumphosphatpuffer verwendet.



**Abb. 48.** Störende Aldehydspuren werden durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) zur Säure oxidiert. Das dabei entstehende NADH wird mittels Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Pyruvat wieder zu  $NAD^+$  recycelt

Dieser Versuch wurde zunächst in D<sub>2</sub>O-TEA-Puffer durchgeführt; dabei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und per NMR analysiert (Abb. 49.). Da die 4-Hydroxyhexan-2-on-Lösung trüb war, was möglicherweise auf Eliminierungsprodukte zurückzuführen ist, wurde es vor der Verwendung in Puffer gelöst und in *Eppendorf*-Gefäßen zentrifugiert. Dabei lagerten sich die Eliminierungsprodukte an der hydrophoben Plastikwand an und die klare Lösung konnte für den weiteren Versuchsablauf entnommen werden.

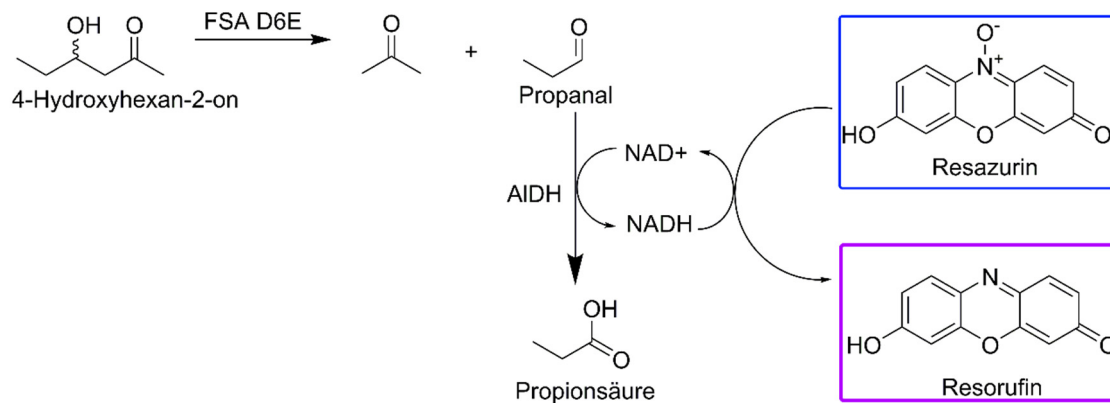


**Abb. 49.** Abnahme der Aldehydsignale durch das Aldehyddehydrogenase/Lactatdehydrogenase-Pyruvat-System.

Da das System anscheinend in der Lage war, Aldehydspuren effektiv zu beseitigen, wurde eine Testreaktion mit aldehydfreiem 4-Hydroxyhexan-2-on, NBT und FSA D6E durchgeführt. Dabei war eine Denaturierung von Enzymen - wahrscheinlich durch die pH-Wert-Änderung durch Pyruvat - zu beobachten. Bei der weiteren Durchführung adsorbierte das farbige NBT an diesen Präzipitaten, so dass die Lösung teilweise entfärbt wurde. Da beim späteren Hochdurchsatzscreening mit 96-Well-Platten Zelltrümmer nicht auszuschließen sind, wurde untersucht, ob das NBT ebenfalls an diese bindet. Dies war der Fall, weswegen NBT als Farbstoff für ein einfaches und robustes Hochdurchsatzscreening wenig geeignet schien. Aus diesem Grund wurde es durch den Farbstoff Resazurin ersetzt. Bei diesem konnte kein Adsorptionseffekt an Zelltrümmern beobachtet werden.

### 3.2.8. Resazurin-Assay

Resazurin ist ein blauer, schwach fluoreszierender Redoxfarbstoff und pH-Indikator, welcher durch Reduktion z. B. mittels NADH in den stark fluoreszierenden, pinken Farbstoff Resorufin umgewandelt wird<sup>[106]</sup>. Dadurch war er ein möglicher Ersatz für NBT in dem zu entwickelndem Assay (Abb. 50). Resazurin findet darüber hinaus kommerzielle Anwendung in Verfahren zur Untersuchung von Zellviabilität und der Zytotoxizität<sup>[107]</sup>, da nur lebende Zellen das zur Reduktion nötige NADH produzieren. Es war demnach davon auszugehen, dass ein solcher Farbstoff eher keinen Adsorptionseffekt an Zelltrümmern aufweist.



**Abb. 50.** Resazurinassay: 4-Hydroxyhexan-2-on wird von FSA D6E in Aceton und Propanal gespalten. Dieses wird von der Aldehyddehydrogenase (AIDH) zu Propionsäure oxidiert. Die Elektronen werden gleichzeitig auf NAD<sup>+</sup> übertragen. Das so entstandene NADH reduziert den blauen Farbstoff Resazurin zum pinken Resorufin und wird dabei wieder zu NAD<sup>+</sup> umgewandelt

Um Resazurin auf seine Tauglichkeit als NBT-Ersatz zu untersuchen, wurde zunächst in einem Vorversuch die Geschwindigkeit der Farbstoffreduktion durch NADH getestet. Dabei wurde eine Resazurininlösung mit verschiedenen konzentrierten NADH-Lösungen gemischt (Tabelle 3.).

**Tabelle 3.** Verfärbung von Resazurin durch verschiedene NADH-Konzentrationen

NADH [nM]	Diaphorase [U]	Zeit bis Farbveränderung [min]	Zeit bis zur vollständigen Färbung
7000	-	10	2 h
700	-	10	-
70	-	Über Nacht	-
7	-	Über Nacht	-
-	-	-	-

Da der Farbumschlag - gerade bei den im Assay zu erwartenden geringen NADH-Konzentrationen - zu langsam war, bot es sich an, abweichend von Literaturangaben, auch hier die Diaphorase für die Übertragung der NADH-Elektronen einzusetzen<sup>[108]</sup>. Ein Farbumschlag fand somit sofort statt, eine Negativkontrolle mit hohen NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen blieb blau. Um dieses System zu optimieren, wurde Resazurininlösung mit verschiedenen Konzentrationen an NAD<sup>+</sup>, Diaphorase, Aldehyddehydrogenase und Propanal getestet (Tabelle 4.). Die dabei eingesetzte Negativkontrolle zeigte nach mehreren Minuten ebenfalls eine leichte Färbung. Da das Resazurinsystem sehr empfindlich ist<sup>[108]</sup>, handelt es sich vermutlich um Spuren von NADH, welche in den Enzymlösungen meistens vorhanden sind.



**Tabelle 4.** Verfärbung von Resazurin durch aus Propanal-Oxidation entstandene und mittels Diaphorase übertragende NADH

Aldehyddehydrogenase [ $\mu$ l]	Diaphorase [U]	NAD <sup>+</sup> [mM]	Propanal [M]	Zeit bis zur Farbänderung [min]
10	1,50	7,0	-	10
1	0,15	0,7	-	30
10	1,50	7,0	1,1	~0,025
1	0,15	0,7	1,1	1
-	-	-	1,1	-
-	1,50	-	-	-

Nachdem Resazurin in Kombination mit der Diaphorase als Farbstoff für den Aldehydnachweis geeignet schien, wurde ein Assay mit 4-Hydroxyhexan-2-on getestet, welches zuvor mit dem Lactat-Dehydrogenase-System von Aldehydspuren befreit wurde.

### 3.2.9. Kombiniertes Resazurinassay

Dazu wurde aldehydfreie 4-Hydroxyhexan-2-on-Lösung mit verschiedenen Konzentrationen an Diaphorase, Aldehyddehydrogenase und FSA D6E versetzt. Die Fluoreszenzemission wurde nach 30-minütiger Reaktionszeit gemessen (Tabelle 5):

**Tabelle 5.** Verfärbung von Resazurin durch Freisetzung von NADH aus gekoppelten enzymatischen Reaktionen

Aldehyddehydr ogenase [ $\mu$ l]	Diaphorase [U]	FSA D6E [ $\mu$ g]	4-Hydroxyhexan-2-on [mM]	Emission nach 30 Min. bei 590 nm [Counts pro Min.]
-	0,15	570	12	4257
20	0,15	570	12	5026
-	0,15	285	12	845
20	0,15	285	12	1643
-	0,15	57	12	206
20	0,15	57	12	607

Als Negativkontrolle wurde 4-Hydroxyhexan-2-on in Resazurinlösung gegeben, worauf keine Färbung beobachtet werden konnte. Als weitere Kontrolle wurde FSA D6E mit der Resazurinlösung gemischt. Dies führte zu einer starken Verfärbung. Da es nahelag, dass das Reduktionsmittel DTT, welches der FSA als Schutz vor Oxidation beigemischt wurde<sup>[60]</sup>, den Redoxfarbstoff Resazurin reduziert, wurde Resazurinlösung mit verschiedenen konzentrierten DTT-Lösungen versetzt, um dies zu überprüfen. Die Emission wurde nach 5 Min. gemessen (Tabelle 6).

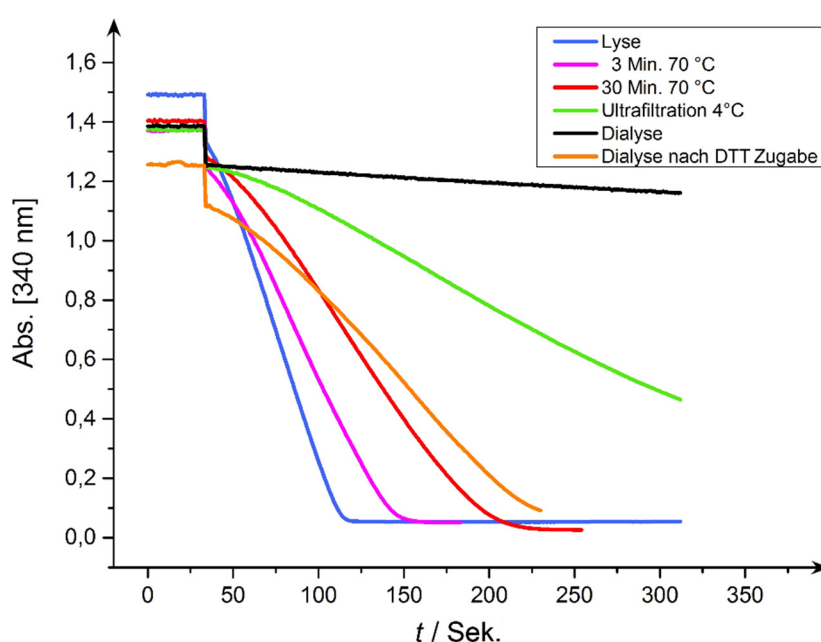
**Tabelle 6.** Verfärbung von Resazurin durch DTT

DTT [ $\mu$ M]	Emission bei 590 nm
100000	2514
10000	3576
1000	410
100	48
10	23
1	37
0	5

DTT schien also Resazurin zu reduzieren, womit die unterschiedliche starke Färbung von Resazurin durch verschieden stark konzentrierte FSA-Lösungen in Tabelle 5. erklärt werden konnte. Denn je höher die FSA-Konzentration war, desto höher lag auch die DTT-Konzentration in der Probe. Ein weiterer Versuch mit NBT zeigte ebenfalls eine Färbung durch DTT. Bei einer Gesamtkonzentration von unter 100 nM war diese jedoch nicht vollständig. Da DTT NADH-basierte Farbstoffassays offensichtlich stört, war es sinnvoll zu überprüfen, ob es tatsächlich für die Aufrechterhaltung der Aktivität der FSA nötig war und wenn ja, welche Bedingungen für den Aktivitätsverlust verantwortlich sind.

### 3.2.10. Einfluss von DTT auf die FSA-Aktivität

Um diesen Einfluss von DTT zu überprüfen wurde *fsa* wt exprimiert, anschließend wurden die Zellen lysiert und aliquotiert. Danach wurde das Lysat auf verschiedene Arten aufgearbeitet (Tabelle 7). Am Ende jedes Aufarbeitungsschrittes wurde die Probe bis zur Aktivitätsmessung eingefroren. Durch Hitzeaufreinigung entstandene Präzipitate wurden mittels Zentrifugation entfernt<sup>[69]</sup>. Da sich das Volumen der Proben im Laufe der unterschiedlichen Aufreinigungsschritte veränderte, wurde von jeder Probe 100 µl entnommen und mit TEA-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Davon wurden je 100 µl entnommen und für ein D-Fructose-6-phosphat-Assay verwendet (Abb. 51.). Die Aufreinigung mit Dialyse und Ultrafiltration machte es aus technischen Gründen nötig, mit einem größeren Volumen zu arbeiten, daher wurde dementsprechend nur ein Teil zur weiteren Messung verwendet.



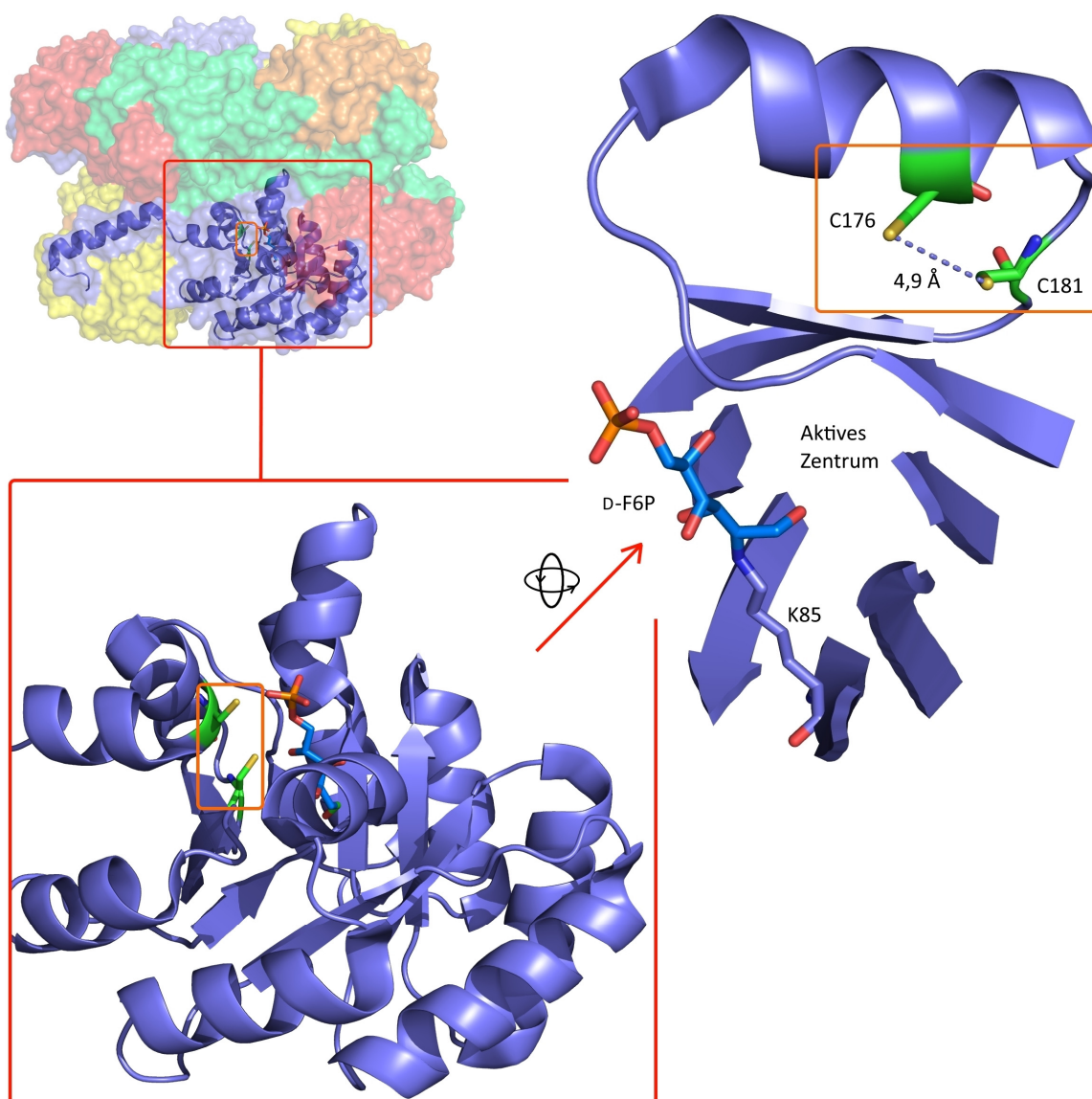
**Abb. 51.** FSA-Kinetik nach verschiedenen Proteinaufreinigungsschritten und nach Zugabe von DTT

**Tabelle 7.** Einfluss von DTT auf die FSA-Aktivität nach verschiedenen Proteinaufreinigungsschritten

Aufarbeitungsschritt	FSA Aufarbeitungsschritte	Aktivität %, bezogen auf FSA nach der Lyse
A	FSA wt nach Lyse	100
B	Wie A und Inkubation für 5 Min. bei 70 °C	70
C	Wie A und Inkubation für 30 Min. bei 70 °C	45
D	Wie C und Ultrafiltration bei 4°C, über Nacht	18
E	Wie C nach Dialyse über Nacht (RT)	3
F	Wie E, danach Zugabe von DTT (2 mM), 1 h	30

Als Kontrolle wurde das Experiment wiederholt, dem Lysat wurde jedoch von Anfang an DTT zugesetzt. Auch enthielt die Dialyselösung DTT. Nun konnte nach den unterschiedlichen Aufreinigungsschritten kein Aktivitätsverlust mehr festgestellt werden. Lediglich nach der

Aufreinigung durch Dialyse sank die Aktivität der FSA auf 50 %. Als weiteres Experiment wurde hitzeaufgereinigte FSA<sup>[69]</sup> (C) entweder eingefroren oder für 20 Tage bei RT inkubiert. Der Aktivitätsverlust bei der inkubierten Probe betrug ca. 10 %. Die Anwesenheit von DTT scheint für die Aktivität der FSA folglich zwingend notwendig zu sein, weswegen ein Assay mit NBT oder Resazurin aufgrund der falsch-positiven Färbung nicht möglich ist. Auch war davon auszugehen, dass andere Redoxfarbstoffe, welche die Anwesenheit von NADH sichtbar machen sollten, gleiche Probleme aufweisen würden. Der Grund für den FSA-Aktivitätsverlust liegt möglicherweise in den Aminosäuren C176 und C181 begründet. Deren Thiolgruppen liegen ca. 4,9 Å voneinander entfernt und wären somit in der Lage, eine Disulfidbrücke auszubilden. C 176 liegt am Ende einer Alpha-helix während C181 sich in einem Loop befindet, welcher die Alpha-helix mit dem Beta-Barrel des aktiven Zentrums verbindet (Abb. 52). Da sich sonst keine weiteren Cysteine in der FSA befinden, ist aufgrund der exponierten Position beider Thiolgruppen zueinander davon auszugehen, dass hier die Ursache für die Notwendigkeit von DTT zur Aufrechterhaltung der FSA-Aktivität begründet liegt.



**Abb. 52.** Aktives Zentrum der FSA mit durch - K85 gebundenem - D-Fructose-6-phosphat sowie eine das *beta*-barrel stabilisierende Alpha-helix, welche die möglicherweise eine Disulfidbrücke ausbildenden Aminosäuren C176 und C181 enthält<sup>[75]</sup>.

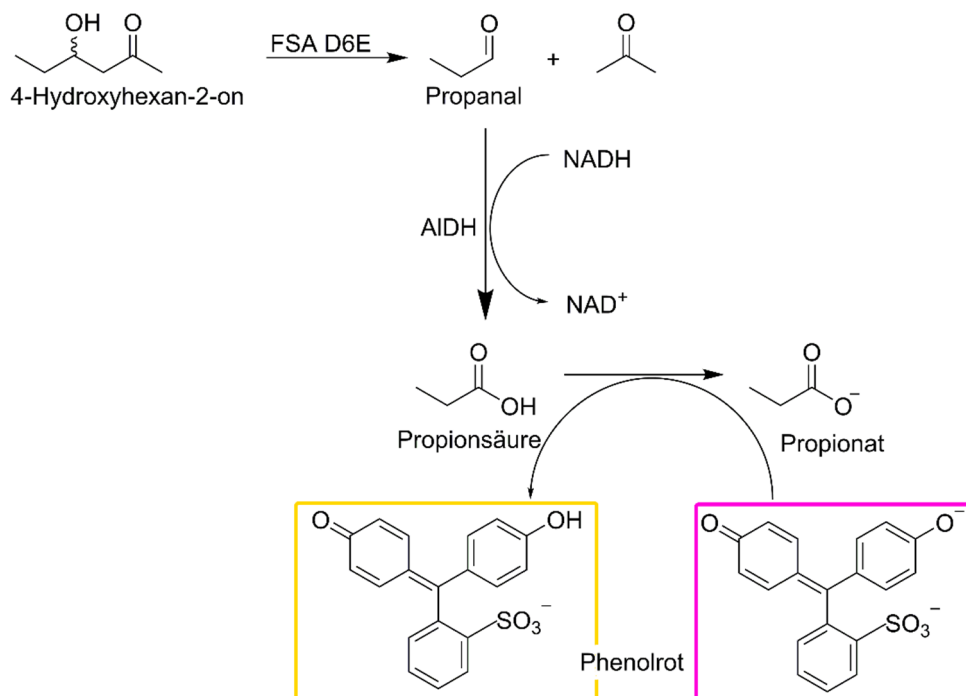
Da die Aktivität der FSA nur durch Anwesenheit von DTT sichergestellt werden kann und die Kristallisation der FSA ebenfalls unter Anwesenheit von DTT stattfand<sup>[74]</sup>, muss davon ausgegangen werden, dass die reduzierte Form die aktive und somit natürliche Form ist. Damit besitzt die FSA anscheinend einen molekularen Schalter, der sie unter oxidativen Bedingungen deaktiviert. Möglicherweise ist die FSA an Stoffwechselwegen beteiligt, die unter oxidativem Stress deaktiviert werden<sup>[109,109,110]</sup>. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die FSA unter bestimmten anaeroben Bedingungen sezerniert wird und beim Wechsel der Zellumgebung zu aerob/oxidativ inaktiviert werden muss.

Die Entwicklung eines nicht Redoxfarbstoff-abhängigen kolorimetrischen Assays war aus diesen Gründen notwendig. Da bei der Oxidation von Propanal eine Säure entsteht, bot es sich an, ein auf einem pH-Indikator basiertes Assay zu verwenden<sup>[111]</sup> (Abb. 53.).

---

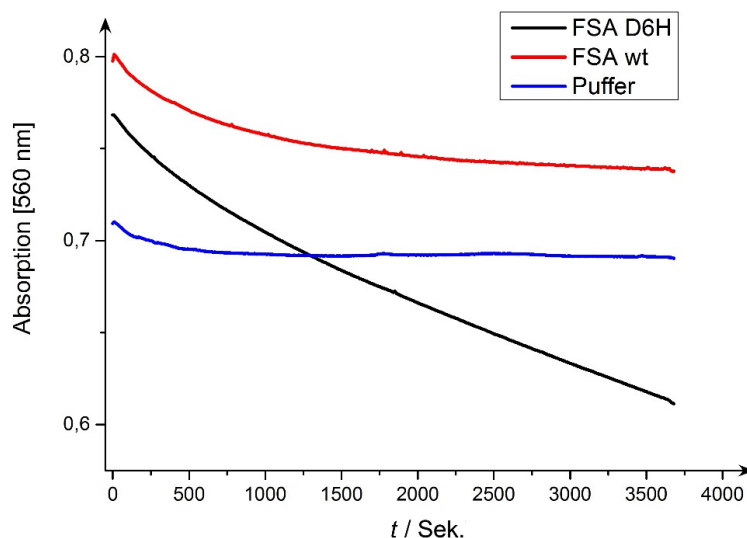
### 3.2.11. Phenolrot-Assay

Für den Nachweis der FSA-Aktivität über einen pH-Indikator sollten die Protonen, welche bei der Oxidation des von der FSA freigesetzten Propanals entstehen, direkt an einen pH-Indikator weitergegeben werden wodurch es zu einer detektierbaren Farbänderung kommt (Abb. 53.).



**Abb. 53.** PH-Assay: 4-Hydroxyhexan-2-on wird durch die FSA in Aceton und Propanal gespalten, welches durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) zur Propionsäure oxidiert wird. Die von der Säure freigesetzten Protonen werden auf Phenolrot übertragen, wodurch eine Farbänderung hervorgerufen wird.

Um dies zu gewährleisten verwendet man sehr schwach gepufferte Lösungen, um die pH-Wert-Änderung nicht abzufangen. Der pH-Indikator muss einen Umschlagspunkt nahe dem  $pK_s$  des Puffers haben, damit die durch die Reaktion erzeugten Protonen gleichermaßen direkt auf den pH-Indikator übertragen werden und nicht nur auf den Puffer. Nur so ist eine lineare Messung möglich. Als Testsystem wurde Phenolrot in 2 mM TEA-Puffer mit Aldehyddehydrogenase versetzt. Eine andere Puffer-Lösung wurde mit NAD<sup>+</sup> und Butanal hergestellt. Da NAD<sup>+</sup> nicht recycelt wird, wurde eine 6 mM Konzentration verwendet. Beide Lösungen wurden auf exakt den gleichen pH-Wert eingestellt. Nach dem Mischen fiel dieser innerhalb von 30 Minuten, die Lösung färbte sich gelb. Da der Assay also in der Lage ist, Aldehyde kolorimetrisch nachzuweisen, wurde von einer Phenolrotlösung sowohl im Basischen als im Säuren ein Absorptionsspektrum aufgenommen, um die für die Messung optimale Wellenlänge herauszufinden. Diese lag bei 560 nm. Anschließend wurde eine Pufferlösung mit zentrifugiertem 4-Hydroxyhexan-2-on, Phenolrot und NAD<sup>+</sup> hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 8,2 eingestellt. Da dies bei schwach gepufferten Lösungen leicht zu pH-Wert-Spitzen führen kann, wurde erst danach Aldehyddehydrogenase und DTT hinzugefügt. Der fallende pH-Werte wurde nun immer wieder auf pH 8,3 eingestellt bis der vorhandene Aldehyd vollständig oxidiert war. Nun wurde eine Enzymlösung des gleichen pH-Wertes mit FSA D6H und FSA wt hergestellt. Der exakt gleiche pH-Wert war notwendig, da es sonst schon beim Mischen der Lösungen zu einer Farbveränderung und damit zu einer Messverfälschung kommen konnte. Die Lösungen wurden gemischt und in einem Spektrometer vermessen (Abb. 54.).



**Abb. 54.** Phenolrotkinetik von FSA D6H vs FSA bei 560 nm

Der anfängliche Abfall der Absorption (bis Sekunde 500) ist möglicherweise auf Mischungseffekte oder minimale Restspuren an verunreinigenden Aldehyden zurückzuführen. Nach 24 h wurde ein Bild aufgenommen (Abb. 55.).



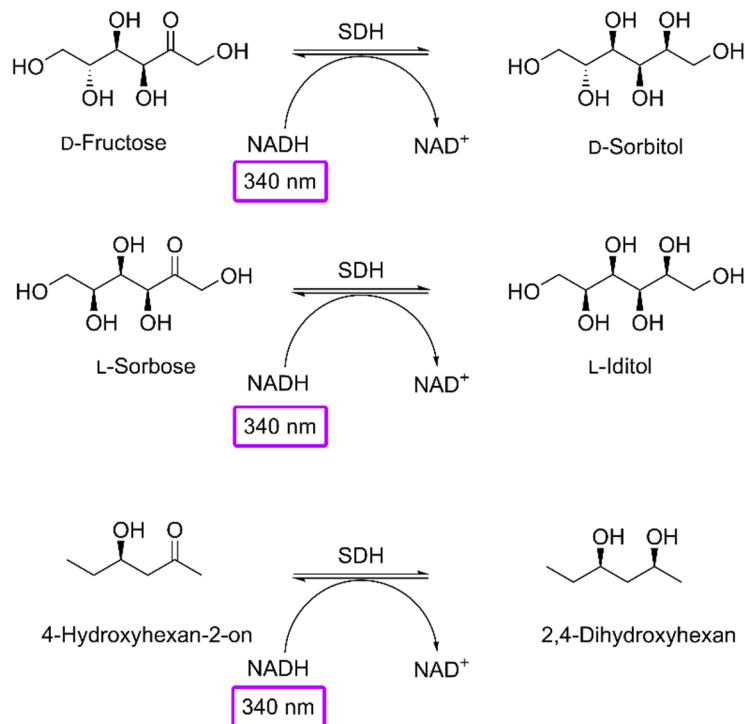
**Abb. 55.** Phenolrotassay von FSA D6H vs FSA wt und ohne FSA

Der pH-Assay scheint also prinzipiell in der Lage zu sein die Spaltungskinetik von 4-Hydroxyhexan-2-on durch FSA zu detektieren. Da der pH-Wert während des Aldehydquenchtings jedoch immer wieder neu eingestellt werden muss und dies bei einer so schwach gepufferten Lösung zu starken pH-Schwankungen führen kann, ist es nicht ausgeschlossen, dass die Aldehyddehydrogenaseaktivität in der Substratlösung bei jeder neuen Herstellung verschieden ist. Auch das exakte Einstellen von 96-Enzymlösungen aus einer 96-Well Platte ist mit einer gewissen Fehleranfälligkeit behaftet, so dass dieser Assay für eine praktische Anwendung nur bedingt geeignet ist.

Da die Probleme eines auf 4-Hydroxyhexan-2-on basierten, robusten Assaysystems nicht zufriedenstellend gelöst werden konnten und ein, auf einem anderen Aldehyd aufbauendes Assaysubstrat wahrscheinlich die gleichen Probleme verursachen würde, war es interessant ein alternatives System in Synthesrichtung zu etablieren. Dabei war die Herausforderung, dass bei einer Aldoladdition eines Aldehyds oder Hydroxyaldehyds mit einem Keton oder einem anderen Aldehyd keine neuartigen funktionellen Gruppen entstehen, die mit einer spezifischen Reaktion nachgewiesen werden könnten. Lediglich die Summe der Aldehydgruppen würde weniger werden. Auch der Vorteil der Aldolase, auf keinen Co-Faktor angewiesen zu sein und eine Atomökonomie von 100 % zu besitzen, war hier von Nachteil, da so keine indirekte Detektion durch Nebenprodukte möglich war. Da ein direkter Nachweis durch eine spezifische Reaktion so nicht möglich war, musste das neue Assay auf der Anzahl und der räumlichen Anordnung der funktionellen Gruppen des neuen Moleküls basieren. Zunächst wurde hierfür die Sorbitol-Dehydrogenase getestet.

### 3.2.12. Sorbitol-Dehydrogenase-Assay

Sorbitol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.14) reduziert D-Fructose zu D-Sorbitol, kann jedoch auch eine Vielzahl anderer Ketosen reduzieren, wie L-Sorbose zum analogen L-Iditol<sup>[112]</sup>. Das mit FSA hergestelltes 4-Hydroxyhexan-2-on die gleiche Konfiguration wie Fructose aufweist, wäre eine Umsetzung durch die Sorbitol-Dehydrogenase prinzipiell denkbar (Abb. 56.).



**Abb. 56.** Verschiedene Reaktionen der Sorbitol-Dehydrogenase (SDH) sowie die mögliche Reduktion von 4-Hydroxyhexan-2-on

Um dieses System zu testen, wurde Sorbitol-Dehydrogenase mit NAD<sup>+</sup> und Sorbitol vermischt. Die Absorptionsänderung wurde bei 340 nm gemessen, es fand eine Absorptionszunahme statt. Nun wurde das gleiche Experiment mit 4-Hydroxyhexan-2-on (12 mM) statt Sorbitol und NADH statt NAD<sup>+</sup> durchgeführt. Hier wurde keine Absorptionsänderung festgestellt. Möglicherweise war der  $K_m$ -Wert wegen der geringen Anzahl an Hydroxygruppen zu ungünstig. Da bei einem Hochdurchsatz-Screening nur geringe Mengen an Produkt entstehen, war die Wiederholung des Experimentes mit einer höheren Konzentration an 4-Hydroxyhexan-2-on nicht zielführend.



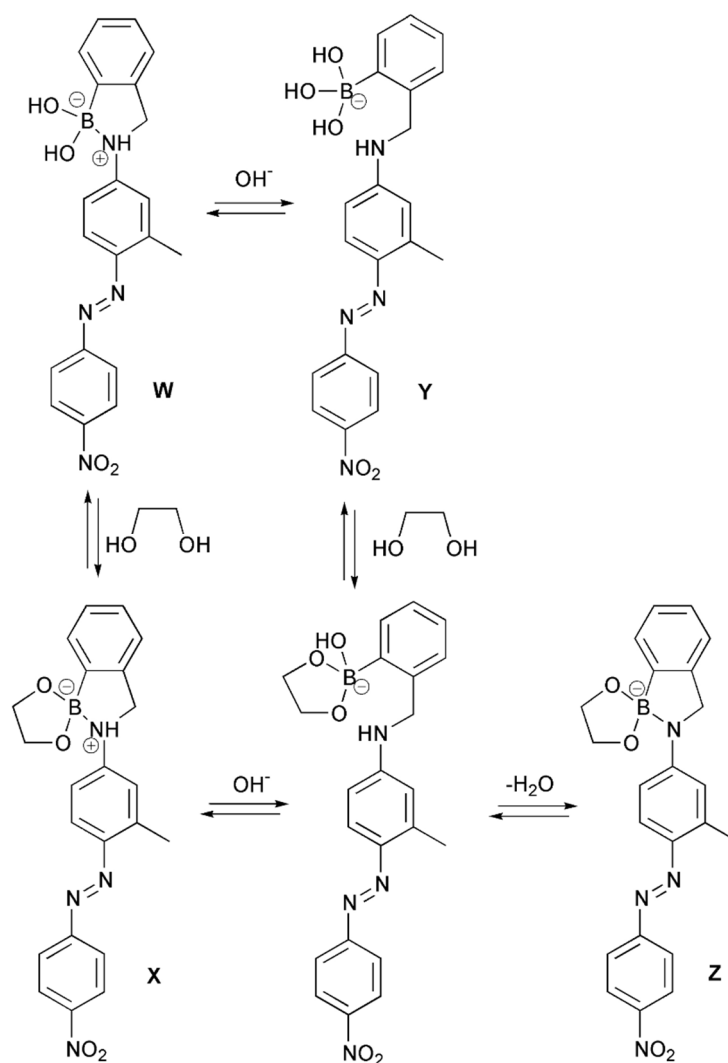
### 3.2.13. Borsäureazofarbstoff-Assay

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises von 4-Hydroxyhexan-2-on wäre die komplexbildende Fähigkeit der  $\beta$ -Hydroxyketon-Gruppierung bzw. nach Reduktion der Ketogruppe die komplexbildende Fähigkeit von 1,3-Diolen. Eine Komplexierung mit Übergangsmetallen scheidet hierbei aus, da deren Farbänderung von der  $d$ -Orbital-Aufspaltung der Liganden abhängig ist. Da jedoch neben den Sauerstoffatomen von 4-Hydroxyhexan-2-on das als Lösungsmittel verwendete Wasser ebenfalls an den Metallionen koordinieren kann und die Ligandenfeldaufspaltung von beiden Verbindungen aufgrund der Koordination durch die Sauerstoffatome wahrscheinlich ähnlich ist, würde man keine Farbveränderung beobachten<sup>[113]</sup>. Eine interessante Möglichkeit des selektiven kolorimetrischen Nachweises von 1,2-Hydroxyverbindungen ist die Verwendung von *N*-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-[3-methyl-4-(4-nitrophenylazo)-phenyl]amin<sup>[85,112,114]</sup>. Dieses Molekül besteht aus einem Azofarbstoff, welcher über ein Amin mit einem eine Borsäuregruppe tragenden Benzylrest verbunden ist. Das Boratom ist aufgrund seiner räumlichen Position in der Lage, eine Bindung zur Aminogruppe auszubilden. Durch diese elektronische Umgebung werden die Energielevel des  $n$  und  $\pi^*$ -Orbitals des Azofarbstoffes beeinflusst, wodurch es zu einer Änderung der Absorptionswellenlänge und damit zur Farbveränderung kommt (Abb. 58. W). In einer Lösung ohne 1,2-Diole wird diese B-N-Bindung bei einem höheren pH-Wert durch Hydroxydionen zerstört (Abb. 58. Y). Dadurch ändert sich die elektronische Umgebung und der Farbstoff erscheint violett. Gibt man nun ein 1,2-Diol zur Lösung, bindet dieses an das Boratom, was dessen Lewis-Säure-Stärke erhöht. Dabei wird die B-N-Bindung verstärkt und das Proton der Aminogruppe wird stärker sauer. Steigt nun der pH-Wert, wird die Aminogruppe deprotoniert, die stärkere B-N-Bindung bleibt jedoch bestehen, die Farbe ist rot (Abb. 58. Z). Eine Differenzierung zwischen 1,2-Diol-haltiger Flüssigkeit im Basischen ist so möglich. Um den Farbstoff in einem Assay zu verwenden, muss man das gebildete Hydroxyketon z. B. mit Natriumborhydrid reduzieren. Durch die partielle Hydrolyse des Borhydrids steigt der pH-Wert auf ca. 11, so dass die Lösung basisch genug ist, um farblich die Anwesenheit von 1,2-Diolen anzuzeigen. Da auch 1,3-Diole einen vergleichbar stabilen Sechsringskomplex bilden, sollte dies auch mit 1,3-Diolen funktionieren. Um das System zu testen, wurde der Borsäurefarbstoff, wie in der Literatur beschrieben, hergestellt<sup>[114]</sup>. Der Farbstoff wurde aus Löslichkeitsgründen zunächst in Methanol gelöst und mit der gleichen Menge an TEA-Puffer pH 11,4 gemischt. Nach Zugabe von Fructose, Hydroxyaceton, (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanal oder (2*R*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanol erfolgte ein Farbumschlag von violett zu orange (Abb. 57).



**Abb. 57.** Basische *N*-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-[3-methyl-4-(4-nitrophenylazo)-phenyl]amin-Lösung. Rechts wurden verschiedene Diole, Hydroxyketone oder Hydroxyaldehyde beigemischt.

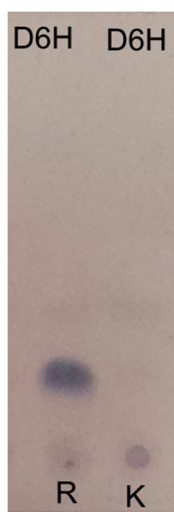
Da der Farbumschlag jedoch auch mit Propanal erfolgte, war das System nicht geeignet, die Bildung von 4-Hydroxyhexan-2-on aus Propanal und Aceton zu detektieren.



**Abb. 58.** Die verschiedenen Spezies von N-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-[3-methyl-4-(4-nitrophenylazo)-phenyl]amin, abhängig vom pH-Wert und der Anwesenheit von 1,2-Diolen<sup>[85,112,114]</sup>

### 3.2.14. Dünnschichtchromatographisches Screening

Aufgrund der Probleme, einen Spaltungsassay zu entwickeln, der für verschiedene Ketone und Aldehyde einsetzbar gewesen wäre, und der Problematik, einen Syntheseassay zu entwickeln, was oft nur für ein bestimmtes Produkt spezifisch ist, wurde entschieden, das FSA-Screening mithilfe von dünnschichtchromatographischer Analyse durchzuführen. Die Methode ist bekannt und sehr robust. Sie ist schnell auswertbar und für nahezu alle organischen Produkte universell anwendbar. Eine densitometrische Analyse erlaubt zudem den Vergleich von relativen Geschwindigkeiten verschiedener Reaktionen. Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktion von FSA D6H mit Aceton und Propanal, bei der die DC-Platte mit Anisaldehyd-Lösung angefärbt wurde, zeigte die Anwendbarkeit dieses Assays.



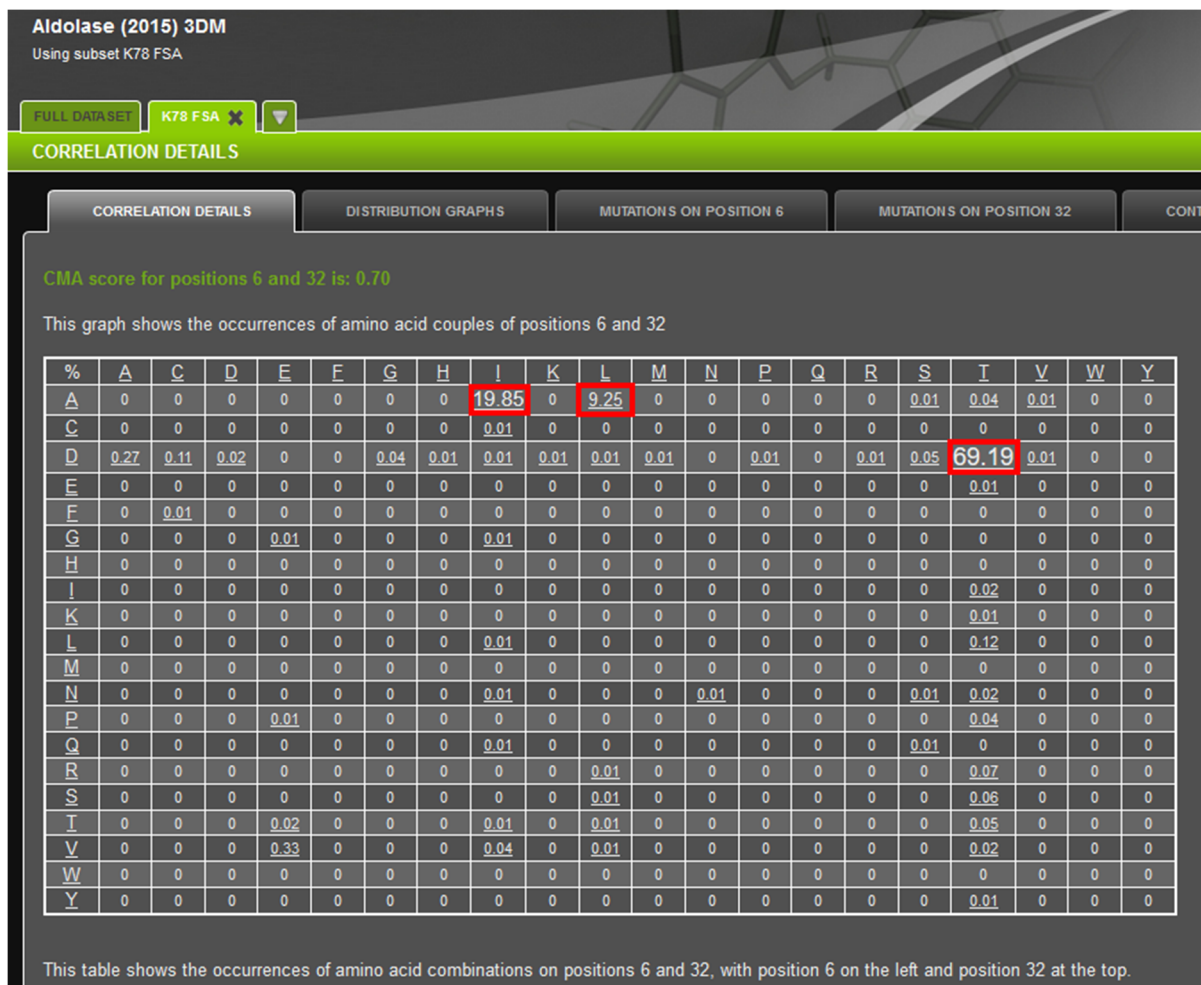
**Abb. 59.** Dünnschichtchromatographische-Analyse der Reaktion von Aceton mit Propanal (R) durch D6H (in ganzen Zellen) sowie der Kontrollreaktion ohne Substrat (K)

Da Propanal und Aceton leicht flüchtig sind, werden sie beim Trocknen und Anfärben der DC-Platte evaporiert, so dass lediglich der Produktpot sichtbar ist.

Die Methode war also in der Lage, als Screeningsystem für verschiedene Aldolreaktionen zu fungieren. Da bei der Analyse mittels Dünnschichtchromatographie ein signifikant geringerer Durchsatz möglich ist als bei einem direkten kolorimetrischen Assay in 96-Well-Platten, war ein Redesign der FSA-Bibliothek notwendig, um die Anzahl der zu untersuchenden Varianten zu verringern.

### 3.3. FSA-Bibliothek Redesign

Um die ursprünglich geplante Bibliothek D6X/T26X/N28X (8000 Varianten) signifikant zu verkleinern, bietet sich der Ansatz einer “*smarte*“ Bibliothek an<sup>[115]</sup>. Hierbei werden nicht nur die zu sättigenden Aminosäurepositionen nach rationalen Gesichtspunkten ausgewählt, sondern auch die eingeführten Aminosäuren, was die Größe der resultierenden Bibliotheken drastisch begrenzen kann. So war es z. B. sinnvoll, in der Bibliothek die Mutation D6L zu nutzen, da dann die ursprüngliche polare Aminosäure gegen eine gleichgroße unpolare Aminosäure substituiert wurde. Ein Austausch gegen unpolare, aromatische Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp) wäre hingegen weniger sinnvoll, da das aktive Zentrum vermutlich sterisch blockiert würde. Um die rationale Planung zu unterstützen, wurde das 3DM-Analysetool von *Bio-product*<sup>[116]</sup> verwendet. Dafür wurde von dem Anbieter eine hoch integrierte *Super-Family-Datenbank* von Aldolase-ähnlichen Proteinen erstellt. Diese enthält 1436 Proteinstrukturen sowie 63306 DNA-Sequenzen, aus welchen eine Proteinstruktur berechnet wurde. Alle diese Strukturen sind der FSA in ihrer Tertiärstruktur ähnlich. Da die Anzahl der Aminosäuren jedoch nicht in allen Proteinen gleich ist, erstellt das Programm bei der virtuellen Überlagerung aller Proteine eine einheitliche, unabhängige 3DM-Nummerierung der faltungs-analogen Aminosäuren, um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dadurch besitzen nicht alle Proteine alle Aminosäurenummern. Gleichzeitig werden alle Publikationen von - in der Datenbank enthaltenen- Enzymen nach bekannten Mutationen durchsucht. Diese Mutationen werden in die 3DM-Nummer übersetzt. Ziel dieses Verfahrens ist es, so auf alle Informationen von Publikationen von Enzymvarianten mit ähnlicher Tertiärstruktur/Funktion zugreifen zu können. Da jedoch nicht alle Proteine in der Datenbank ein ähnliches aktives Zentrum aufweisen und es auch nicht gesichert ist, dass alle DNA-Sequenzen Aldolasen sind, wurde zunächst in der Datenbank eine Subgruppierung erstellt in der alle Enzyme einbezogen wurden, die an der 3DM-Position 78 ein Lysin tragen. Dieses Lysin entspricht der Position K85 in der FSA und stellt das katalytisch aktive Lysin da. So sollte sichergestellt sein, dass die Enzyme dieser Subgruppierung FSA-ähnlich sind. Nun wurde mit dem Tool eine Korrelationsmatrix von Position 6 (entspricht D6 in FSA) mit Position 32 (entspricht T26 in FSA) betrachtet. Dabei wird statistisch analysiert, welche Aminosäuren an Position 6 wie häufig mit welchen Aminosäuren an Position 32 gemeinsam vorkommen. In diesem Falle kam die Variante D6/T32 mit 69,19 % der in der Untergruppe enthaltenden Enzyme am häufigsten, die Variante A6/I26 mit 19,85 % aller Fälle am zweit häufigsten und die Variante A6/L26 mit 9,25 % am dritthäufigsten vor (Abb. 60.). Gemeinsam repräsentieren sie 98,29 % aller gefundenen Korrelationen. Weitere Lösungen blieben unter der 0,5 %-Grenze. Es scheint also eine große Anzahl (>29 %) von FSA-ähnlichen Enzymen zu geben, welche die Aminosäurekombination A6/I32 bzw. A6/L32 als erlaubtes und eventuell funktionelles Element enthalten; hauptsächlich handelt es sich um verschiedene Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolasen aus verschiedenen Spezies.



**Abb. 60.** Korrelationsmatrix des 3DM-Programms für Position 6 und 32 in der Untergruppe der Aldolase-Superfamilie, welche an Position 78 ein Lysin besitzt.

Aus diesem Grund wurde die FSA-Variante D6A/T26I als eine Art Vortest erstellt, um die Leistungsfähigkeit des Programmes hinsichtlich der Vorhersage von die Enzymfunktion ändernden Mutationen zu untersuchen. Ein positives Ergebnis würde darüber hinaus die Auswahl der zu mutierenden Aminosäurepositionen legitimieren. Zur Herstellung von FSA D6A/T26I wurde das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* verwendet. Dazu wurde *fsa* wt-Plasmid mit mutagenen Primern für die Mutation D6A versehen. Anschließend wurde der Plasmid-Primer-Mix mittels *PCR* amplifiziert und das methylierte, parentale Plasmid mittels *DpnI* abgebaut. Durch Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen wurde der bei der Amplifikation entstandene Strangbruch (*nick*) repariert (Abb. 61.).

Das so entstandene Plasmid *fsa* D6A wurde aus den Zellen mittels Plasmidisolationskit extrahiert und erneut einer Mutagenese - mit einem mutagenen Primer für die Mutation T26I - unterworfen.

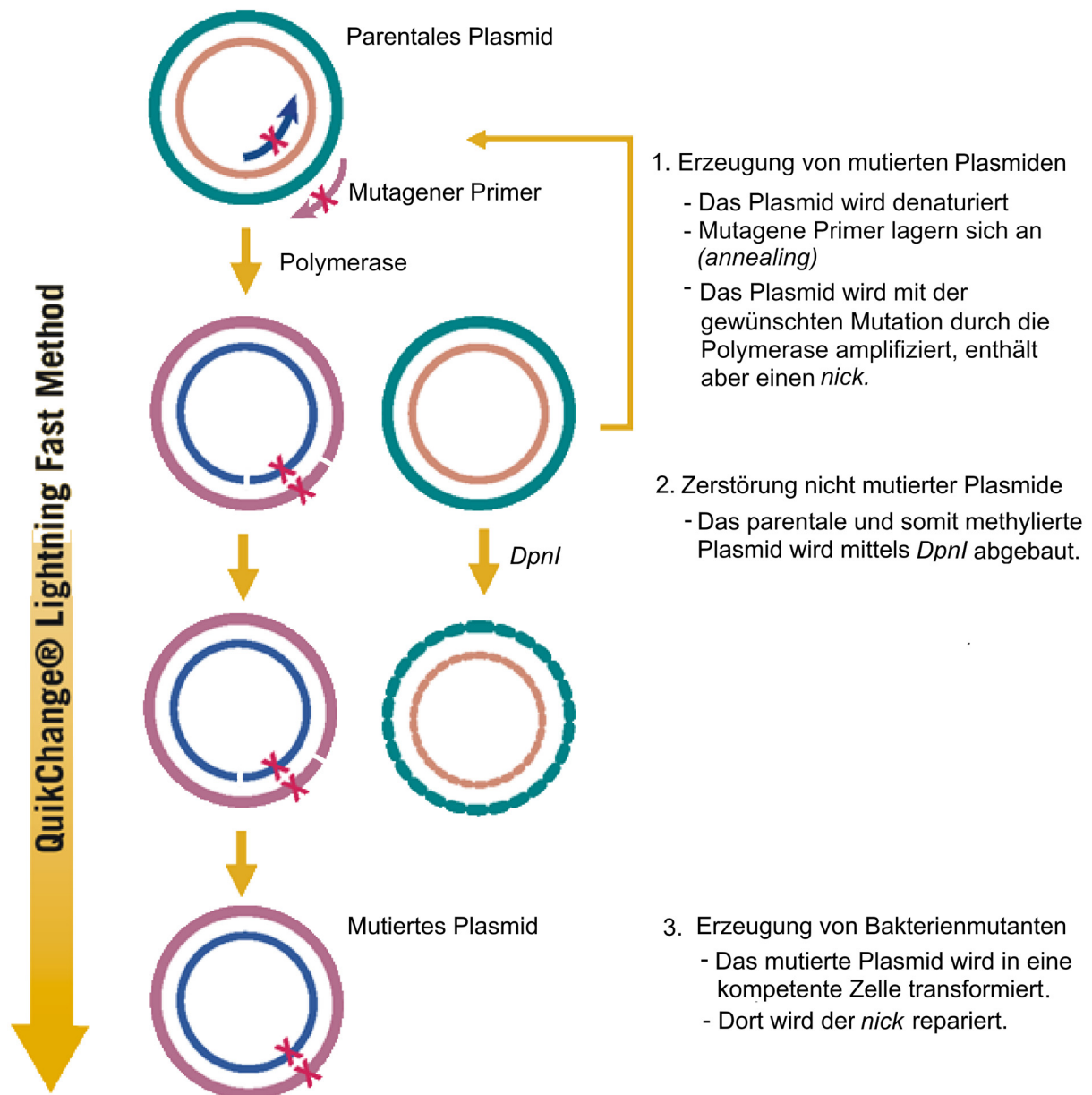
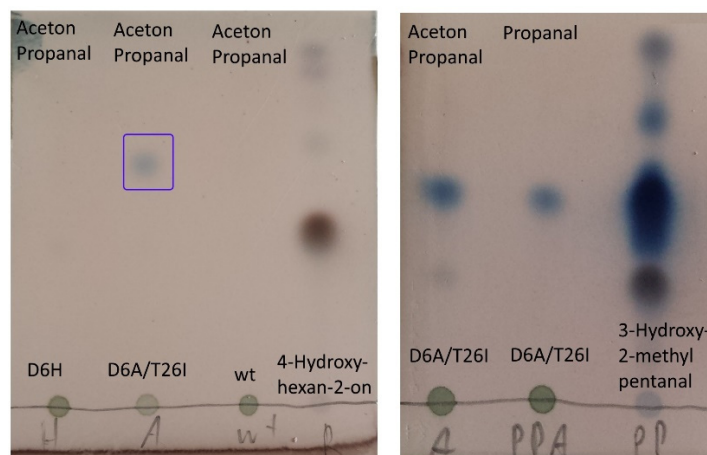


Abb. 61. Herstellung von Mutanten mittels *QuickChange Lightning Kit*. Modifiziert nach<sup>[117]</sup>.

Das Plasmid wurde in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen überexprimiert, die Zellen mittels Lysozym aufgeschlossen, die DNA mittels DNase zerstört und die meisten nicht zelleigene Proteine bei 70 °C denaturiert und abgetrennt. Das so aufgereinigt FSA D6A/T26I-Protein wurde mit Aceton und Propanal versetzt. Als Referenz wurde parallel FSA D6H und FSA wt mit Aceton und Propanal versetzt. Bei der dünnschichtchromatographischen Analyse der Reaktion nach 1,5 h stellte sich heraus, dass kein 4-Hydroxyhexan-2-on, dafür aber ein anderes Produkt entstanden war (Abb. 62.). Dessen Bildungsgeschwindigkeit war sogar derjenigen der Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on durch die bekannte D6H-Variante überlegen. Um dies näher zu untersuchen, wurde FSA D6A/T26I einmal mit Aceton und Propanal und ein anderes Mal nur mit Propanal versetzt. Als Referenz wurde 3-Hydroxy-2-methylpentanal mit aufgetragen. Beide Reaktionsansätze erzeugten einen Spot, der nach Anfärbung in Position und Farbe mit 3-Hydroxy-2-methylpentanal übereinstimmte (Abb. 62.)<sup>[118]</sup>, was nahelegt, dass eine Homoaldoladdition von Propanal stattfand.

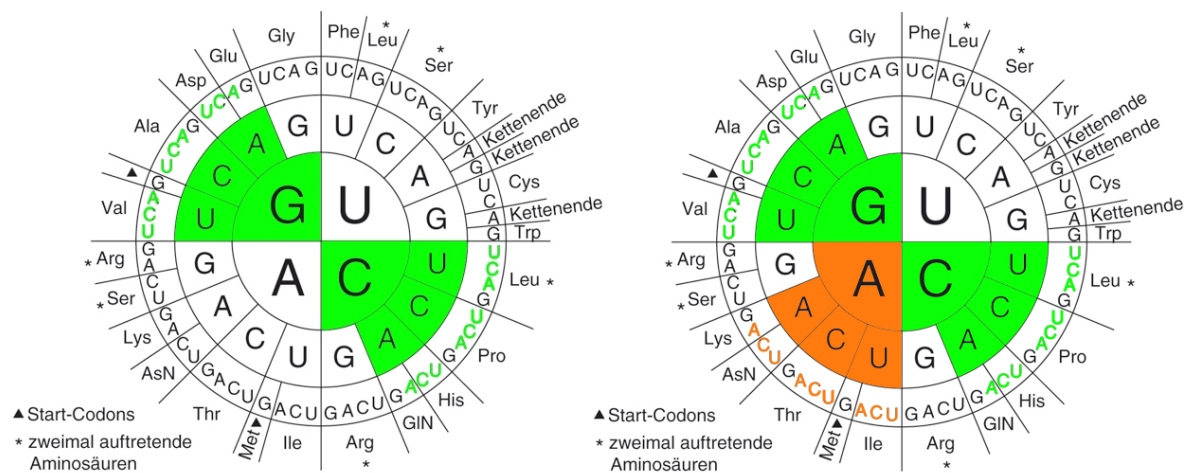


**Abb. 62.** Dünnschichtchromatographische Analyse von FSA-wt, D6H, D6A/T26I mit Aceton und Propanal oder nur mit Propanal als Substrat. Als Vergleichssubstanz wurde links 4-Hydroxyhexan-2-on und rechts 3-Hydroxy-2-methylpentanal verwendet. Die Analyse fand links nach 1,5 h Reaktionszeit und rechts nach 36 h statt. Laufmittel Cy: EtOAc 1:1, Färbemittel Anisaldehyd

Die Positionen 6 und 26 schienen also in der Lage zu sein, die Substratakzeptanz der FSA stark zu beeinflussen. Die FSA-Bibliothek musste also die Aminosäuren A und I enthalten, die Position 6 und 26 schienen sinnvolle Orte für eine Mutation. Bei der Analyse der Position N28 hingegen wurde von dem 3DM-Tool eine Publikation über eine Transaldolase B mit gleicher 3DM-Nummer angezeigt. Der Literaturvergleich<sup>[119]</sup> mit der aus *Escherichia coli* stammenden Transaldolase B - welche ein sehr ähnliches aktives Zentrum wie die FSA besitzt - zeigte, dass der Austausch der zu N28 (in FSA) räumlich identischen Aminosäure N35 (in Transaldolase B) zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Da dies eine Inaktivierung von 95 % aller Varianten in der FSA-Bibliothek nach sich ziehen würde, war es sinnvoll, die Auswirkung von Mutationen von N28 auf die katalytische Aktivität der FSA zu überprüfen. Dafür wurden von den Aceton-akzeptierenden FSA-Varianten D6H, D6E und D6L jeweils eine Bibliothek mit dem *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Abb. 61.) erstellt, bei welcher N28 durch alle anderen Aminosäuren ausgetauscht wurde. Alle so erzeugten FSA-Varianten wurden mit Aceton und Propanal versetzt. Eine dünnschichtchromatographische Analyse zeigte die Inaktivierung aller Varianten, die an Position 28 nicht Wildtyp sind. Da N28 neben der Wasserstoffbrückenbindung zur 3-Hydroxygruppe auch eine zur 4-Hydroxygruppe ausbildet, welche durch die Aldolspaltung zur Aldehydgruppe wird, ist bei Ersatz von N28 mit anderen Resten von einer Störung des Katalysemechanismus auszugehen. Wahrscheinlich stabilisiert N28 das Oxy-Anion des Zwischenproduktes und ist somit für die Aktivität essenziell. Aus diesem Grund wurde die Bibliothek nur noch mit den verbliebenden Positionen 6 und 26 geplant.



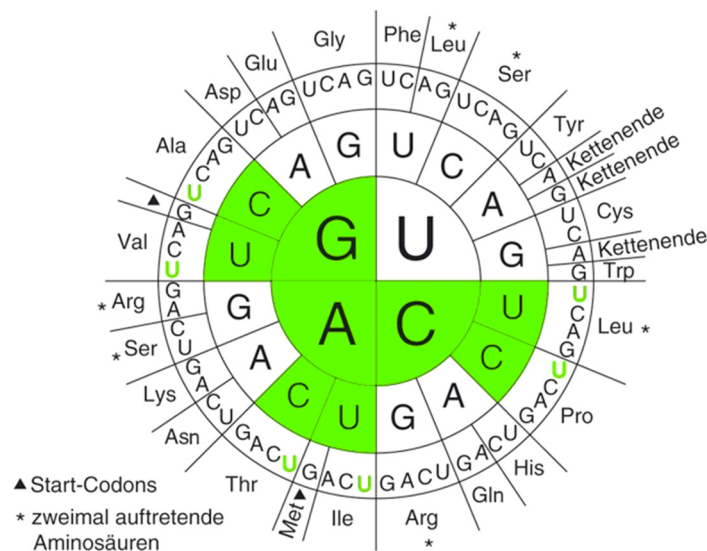
Position 6 musste dabei den *Wildtyp* Asp enthalten, einerseits als Kontrolle, andererseits da nur so Informationen über die alleinigen Auswirkungen der zweiten Mutationsstelle 26 erlangt werden können. Ala war aufgrund der 3DM-Analyse, His, Glu und Leu aufgrund der intern von Clapés *et al.* gefundenen Akzeptanz von Aceton Bestandteil der Bibliothek. Des Weiteren war Val wegen seiner unpolaren und kleineren Struktur sinnvoll. Betrachtet man die Code-Sonne mit den für diese Aminosäuren notwendigen Nukleotiden (Abb. 63) fällt auf, dass die Erweiterung von einzelnen, weiteren sinnvollen Aminosäuren, wie Ile oder Cys zu einer unbeabsichtigt starken Vergrößerung der Bibliothek geführt hätte. Lediglich Gly und Arg wären gemeinsam möglich. Arg wäre zu groß und polar, während Gly aufgrund seiner destabilisierenden Wirkung auf die Proteinfaltung keinen so großen Nutzen versprach, dass eine Vergrößerung der Bibliothek sinnvoll erschien. Aus dieser Überlegung heraus wurde für die Erstellung der FSA-Bibliothek der Primermix SHH gewählt, welcher aufgrund der Beschaffenheit des genetischen Codes zusätzlich für die Aminosäuren Pro und Gln codiert.



**Abb. 63.** Codesonne modifiziert nach<sup>[120]</sup>. In der linken Code-Sonne sind alle Aminosäuren grün markiert, welche von SHH codiert werden. Rechts werden die zwingend erhaltenden Aminosäuren in orange gezeigt, wenn man auch Isoleucin zusätzlich in die Bibliothek aufnehmen würde.

Position 26 musste den *Wildtyp* Thr enthalten, da es theoretisch sein könnte, dass diese Aminosäure essenziell für die katalytische Aktivität ist. Somit würde das Weglassen des *Wildtyps* eine mögliche komplette Inaktivierung der Bibliothek nach sich ziehen. Weiterhin musste die Aminosäure Ile aufgrund der 3DM-Analyse enthalten sein. Sinnvoll erschienen darüber hinaus noch die unpolaren Aminosäuren Leu, Val und Ala. Weil das letzte Codon aller ausgewählten Aminosäuren Thymin ist, ist eine Integration in die Bibliothek bei einer geringen Zunahme der Größe möglich. Es wurde der Code VYT gewählt, welcher zusätzlich zu den ausgewählten Aminosäuren lediglich noch Pro enthält (Abb. 64.).



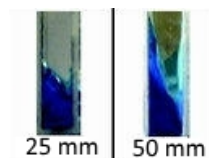


**Abb. 64.** Code-Sonne mit den für Position 26 ausgewählten Nukleotiden. Modifiziert nach<sup>[120]</sup>

So konnte die Anzahl von zu untersuchenden FSA-Varianten durch *smartes* Bibliotheksdesign von 8000 auf 48 mögliche Varianten verringert werden. Anschließend wurde mit dem so designen Plasmidmix, mithilfe des *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits*, eine *fsa*-Mutanten-Bibliothek erstellt. Anschließend wurden *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen mit diesem Plasmidmix transformiert und auf einer Agar-Platte ausplattiert. Von dieser wurden 160 Kolonien zufällig für das Screening ausgewählt, wodurch die Bibliothek statistisch 92,5 % aller erzeugten Varianten enthalten sollte.

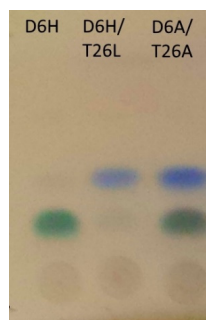
### 3.4. Screening der FSA-Bibliothek D6X/T26X

Um diese 160 Kolonien der FSA-Bibliothek zu *screenen*, wurden sie in eine 96-Well-Platte überführt und nach Inokulation über Nacht mit Glycerol versetzt. Die so erstellten *Master-Platten* können bei -80 °C gelagert werden und dienen so als dauerhaftes Reservoir, um jederzeit neue, identische 96-Well-Bibliothekskopien erstellen zu können. Mit diesen Masterplatten wurde zwei 96-Well-Deep-Well-Platten mit LB-Medium inokuliert. Da in 96-Well-Platten die Sauerstoffzufuhr in der Regel der limitierende Wachstumsfaktor ist, fand die Inkubation bei 30 °C statt. Dadurch ist der Metabolismus und die Sauerstoffaufnahme der *E. coli* Zellen verlangsamt, woraus eine längere Inkubationsdauer aber eine höhere Zelldichte und Proteinmenge resultiert. Gleichzeitig wurde ein Inkubator mit einer hohen Orbitalauslenkung gewählt, um durch den so vergrößerten Wirbel (Abb. 65.) und die daraus vergrößerte Flüssigkeitsoberfläche eine bessere Sauerstoffaufnahme zu gewährleisten<sup>[121]</sup>.



**Abb. 65.** Flüssigkeitswirbel in 96-Well-Wells bei verschiedenen Orbitalauslenkungen (300 rpm)<sup>[122]</sup>

Nach Inkubation und Induktion der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen in TEA-Puffer mit Aceton und Propanal resuspendiert. Aufgrund der hohen Permeabilität der Substrate und der zu erwartenden Produkte<sup>[95]</sup> konnte auf einen Zellaufschluss verzichtet werden. Das Verwenden von ganzen Zellen hat darüber hinaus den Vorteil, dass das exprimierte Protein durch seine natürliche Umgebung vor Inaktivierung und Denaturierung geschützt ist; auch ist keine Zugabe von DTT nötig. Zusätzlich wird so verhindert, dass es zu Proteinkonzentrationsunterschieden in verschiedenen *Wells* aufgrund von unvollständiger Zell-Lyse kommt. Wegen der leichten Oxidierbarkeit von Propanal zur Propionsäure mit pH-Abfall wurde nur frisch destilliertes Propanal verwendet. Nach erneuter Inkubation über mehrere Stunden mit den Substraten wurden die einzelnen *Wells* dünnschichtchromatographisch analysiert. Mit aufgetragene Zellen bleiben dabei am Startpunkt haften und beeinflussen so nicht das Laufverhalten der Produkte. Da Hochdurchsatz-*Screenings* eine gewisse Fehleranfälligkeit aufweisen und um für weitere *Screening*-Experimente die Anzahl an 96-Well-Platten zu reduzieren, wurden die produktbildenden Varianten aus den Masterplatten in eine neuen 96-Well-Platte kopiert (*Rescreening-Library*), aus welcher damit eine neue *Rescreening*-Masterplatte entstand. Mithilfe dieser wurde eine weitere 96-Well-Platte inokuliert und - wie oben beschrieben - erneut einem *Screening* unterworfen. Für eine verbesserte Produkttrennung wurde beim *Rescreening* jedoch Cyclohexan/EtOAc, statt DCM/MeOH als Laufmittel verwendet (Abb. 66.).



**Abb. 66.** Exemplarische Hits im *Rescreening*. Laufmittel Cy: EtOAc, 1:1, Färbung mit Anisaldehyd. Zu besseren Darstellung wurde die Farbsättigung angepasst.

Zwei weitere *Rescreening*-Platten wurden mithilfe der *Rescreening*-Masterplatte inokuliert und induziert. Statt Aceton und Propanal wurden ersatzweise entweder nur Acetaldehyd oder nur Butanal verwendet. Bei beiden *Screenings* konnte jedoch keine Produktbildung durch die FSA-Varianten festgestellt werden. Als Positivkontrolle wurde bei dem *Screening* mit Acetaldehyd ein Well zusätzlich mit Propanal versetzt. Allein dieses Well zeigte eine Produktbildung. Auch eine alternative Anfärbemethode einer DC-Platte mit Cersulfat<sup>[123]</sup> konnte keine Produktbildung detektieren. Bei der Anfärbung der Acetaldehyd-DC-Platten waren jedoch an verschiedenen Stellen kurzzeitig dunkle Schatten an der erwarteten Produktposition zu erkennen, die jedoch innerhalb weniger Sekunden wieder verblasst waren. Aufgrund des geringen Siedepunktes des zu erwartenden Produktes 3-Hydroxybutanal von 85 °C<sup>[124]</sup> wäre es prinzipiell möglich, dass das Produkt beim Erwärmen während des Färbevorganges evaporiert ist.

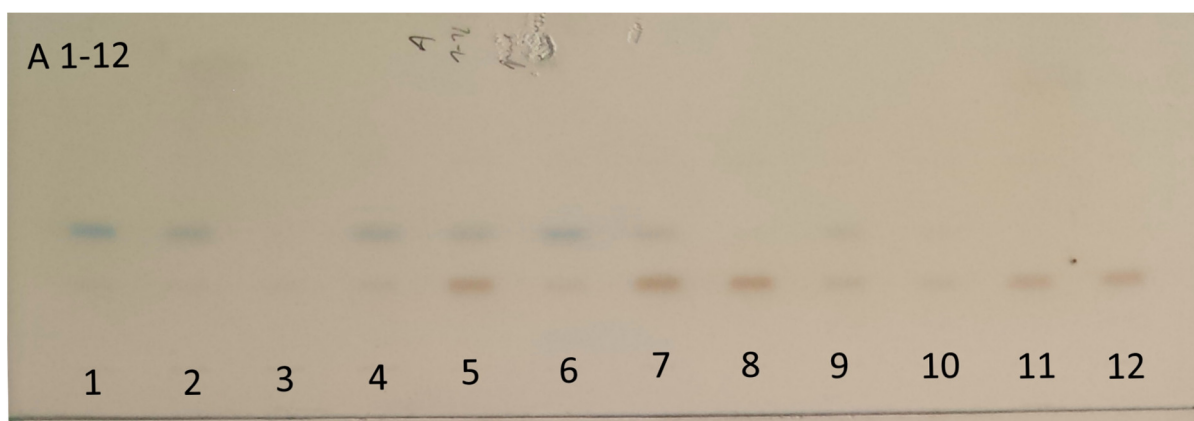
Alle positiven Mutanten wurden mithilfe der *Rescreening*-Masterplatte erneut exprimiert und sequenziert, um ihre genetische Identität aufzuklären. Von jeder aktiven Mutation wurde ein Klon in je zwei *Wells* einer neuen Platte übertragen und so eine neue *Hit*-Masterplatte erstellt (Tabelle 8).

**Tabelle 8.** Belegung der Hit-Masterplatte

Reihe	A	B	C	D	E	F
1	D6Q/T26L	D6Q/T26L	D6A/T26A	D6P/T26I	D6H	D6A/T26A
2	D6H/T26L	D6H/T26L	D6L	D6L	wt	wt
3	D6L/T26L	D6L/T26L	D6V/T26L	D6V/T26L		
4	D6A/T26V	D6A/T26V	D6E/T26A	D6E/T26A		
5	D6E	D6E	D6A	D6A		
6	D6E/T26L	D6E/T26L	D6V/T26V	D6V/T26V		
7	D6V/T26A	D6V/T26A	T26V	T26V		
8	D6H	D6H	D6L/T26A	D6L/T26A		
9	D6A/T26L	D6A/T26L	T26L	T26L		
10	D6E/T26V	D6E/T26V	D6A/T26I	D6A/T26I		
11	D6L/T26V	D6H/T26A	D6P/T26L	D6P/T26L		
12	D6H/T26A	D6L/T26V	D6Q/T26I	D6Q/T26I		

Dies ist sinnvoll, um eine genauere Untersuchung der gefundenen Varianten mittels HPTLC in akzeptabler Zeit zu gewährleisten. Bei dieser Methode entnimmt ein *Autosampler* aus jedem *Well* eine definierte Menge an Flüssigkeit und sprüht diese gleichmäßig mit einer definierten Breite auf eine DC-Platte. Nach dem Entwickeln der DC-Platte und dem Anfärben ist aufgrund der identisch aufgetragenen Menge und der gleichen Form des DC-Spots eine densitometrische Auswertung möglich, welche Rückschlüsse auf die in der aufgetragenen Flüssigkeit vorhandene Konzentration des Produktes ermöglicht. So ist ein Vergleich der FSA-Varianten bezüglich ihrer substratspezifischen Aktivität möglich. Dafür wurden mit der *Hit*-Masterplatte verschiedene *Hit-Screening*-Platten erstellt. Um das HPTLC-Gerät jedoch nicht zu schädigen, wurden die Zellen vor Beginn der Analyse durch Zentrifugation abgetrennt.

Ein Teil des Überstandes wurde in eine neue 96-Well-Platte überführt und mit gleichem Volumen an Methanol verdünnt. Dadurch wurden möglicherweise vorhandene Proteine denaturiert und unlösliche Bestandteile durch erneute Zentrifugation abgetrennt. Danach wurden die Proben durch den *Autosampler* aufgetragen, die DC-Platten entwickelt und angefärbt. Um eine für die densitometrische Auswertung notwendige, gleichmäßige Färbung zu gewährleisten, war es nötig, die DC-Platte unter kontrollierten Bedingungen in einem Ofen zu erwärmen und nicht - wie sonst üblich - mit einer Heißluftpistole. Aufgrund der dadurch längeren Färbezeit kommt es jedoch zur Diffusionsverbreiterung, so dass die Produkt-Spots einen weniger scharf begrenzten Rand besitzen. Da dieser Effekt jedoch alle Spots in gleicher Weise betrifft, war eine densitometrische Auswertung trotzdem möglich. Dieses Experiment wurde zunächst mit Aceton und Propanal durchgeführt (Abb. 67).



**Abb. 67.** HPTLC-Screening ausgewählter FSA-Varianten mit einem Gemisch aus Aceton und Propanal als Substrat. Laufmittel Cy/EtOAc, 1:1. Anfärbung mit Anisaldehyd-Lösung. Zu besserer Darstellung wurde die Farbsättigung angepasst.

Da trotz der standardisierten Vorgehensweise jede DC-Platte eine etwas andere Farbintensität aufweist, konnte nur FSA-Varianten derselben Platte direkt miteinander verglichen werden. Aus diesem Grund wurden jeweils die besten Varianten ausgewählt und gemeinsam auf eine Rescreeningplatte aufgetragen, um sie miteinander vergleichen zu können (Tabelle 9. zweiter Teil). FSA wt wurde mit der Positivkontrolle FSA D6H und der nach optischen Gesichtspunkten sowohl für 4-Hydroxyhexan-2-on als auch für 3-Hydroxy-2-methylpentanal sehr aktiven Variante D6A/T26A jeweils in Reihe E und F plattiert. Diese konnte im Rescreening mit aufgetragen werden und dienten als Vergleich.

**Tabelle 9.** Densitometrische Analyse der 4-Hydroxyhexan-2-on-Spots der FSA D6X/T26X-Bibliothek mit einem Gemisch aus Aceton und Propanal als Substrat ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). D6H wurde als 100 % relative Aktivität definiert, die schnellste Variante wurde fett markiert.

Reihe A	Mutation	Farbdichte	Reihe C	Mutation	Farbdichte
1	D6Q/T26L	1806	1	D6A/T26A	23472
2	D6H/T26L	2329	2	D6L	26092
3	D6L/T26L	2578	3	D6V/T26L	6992
4	D6A/T26V	6619	4	D6E/T26A	25200
5	D6E	13941	5	D6A	27249
6	D6E/T26L	5473	6	D6V/T26V	2807
7	D6V/T26A	13201	7	T26V	11198
8	D6H	14976	8	D6L/T26A	21022
9	D6A/T26L	3557	9	T26L	8155
10	D6E/T26V	5671	10	D6A/T26I	3585
11	D6L/T26V	6246	11	D6P/T26L	1373
12	D6H/T26A	13333	12	D6Q/T26I	3928

### Rescreening

Position	Mutation	Farbdichte $R_f$ 0.1	Unterschied der Farbdichte in % bezogen auf D6H
A5	D6E	15168	90
A8	D6H	16830	100
F1	D6A/T26A	15771	94
F2	wt	3924	23
D2	<b>D6L</b>	<b>18365</b>	<b>109</b>
D5	D6A	15150	90
A7	D6V/T26A	9083	54
A12	D6H/T26A	7489	44
C1	D6A/T26A	16521	98
D4	D6E/T26A	3799	23
D7	T26V	604	0
D8	D6L/T26A	5500	33

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die Einzelmutationen an Position 6 (D6L, D6H, D6A und D6E) mit Abstand die größte Reaktionsgeschwindigkeit verursachen. Lediglich die Doppelvariante D6A/T26A ist ähnlich schnell. Daraus ist zu schließen, dass Mutationen an Position 26 die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Aceton generell negativ beeinflussten. Da alle FSA-Doppelvarianten - die schnell genug waren, um zum *Rescreening* ausgewählt zu werden - an Position 26 jedoch ein Alanin besitzen, ist davon auszugehen, dass der geschwindigkeitsreduzierende Effekt durch diese Aminosäure am schwächsten ausfällt. Bei der Doppelvariante D6A/T26A scheint es jedoch eine besondere synergistische Konstellation zu geben, die die Geschwindigkeit sogar noch leicht erhöht. Da die Variante D6A/T26A im *Rescreening* zweimal vorkommt, lässt darauf schließen, dass die Varianz innerhalb der Methode in etwa im einstelligen Prozentbereich liegt. Wegen der überlagerten Kinetik in der Konkurrenz von Homo- und Kreuz-Aldolreaktion und um die Datenlage zu erweitern, wurde der Versuch zur selektiv gekreuzten Aldolreaktion mit Isovaleraldehyd und Aceton wiederholt (Tabelle 10.). Wegen des größeren und verzweigten Alkylrestes war es unwahrscheinlich, dass es hierbei zu einer Homoaldolreaktion kommt. Tatsächlich wurde bei alleiniger Inkubation von Isovaleraldehyd keine Produktbildung detektiert.

**Tabelle 10.** Densitometrische Analyse der FSA D6X/T26X-Bibliothek mit Aceton und Isovaleraldehyd als Substrat ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ). D6H wurde als 100 % relative Aktivität definiert, die schnellste Variante wurde fett markiert.

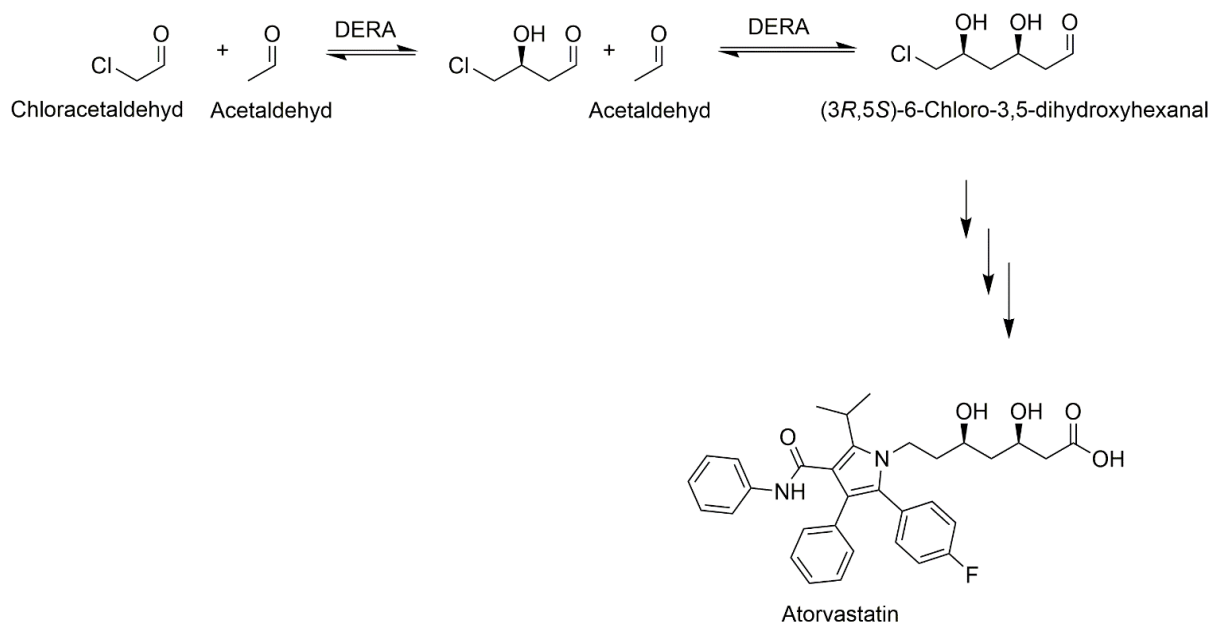
Reihe A	Mutation	Farbdichte	Reihe C	Mutation	Farbdichte
1	D6Q/T26L	510	1	D6A/T26A	2505
2	D6H/T26L	432	2	D6L	12757
3	D6L/T26L	1013	3	D6V/T26L	547
4	D6A/T26V	2416	4	D6E/T26A	6398
5	D6E	8534	5	D6A	7422
6	D6E/T26L	2811	6	D6V/T26V	352
7	D6V/T26A	6472	7	T26V	5000
8	D6H	17840	8	D6L/T26A	3196
9	D6A/T26L	917	9	T26L	3044
10	D6E/T26V	4424	10	D6A/T26I	706
11	D6H/T26A	5770	11	D6P/T26L	321
12	D6L/T26V	2455	12	D6Q/T26I	3193

#### *Rescreening*

Position	Mutation	Farbdichte	Farbdichtedifferenz in % bezogen auf D6H
E1	D6H	21882	89
E2	wt	5633	23
F1	D6A/T26A	2505	10
F2	wt	7060	29
C2	D6L	21882	89
A8	<b>D6H</b>	<b>24484</b>	<b>100</b>
A5	D6E	13834	57
C5	D6A	9717	40
A7	D6V/T26A	7238	30

Interessanterweise war diesmal D6H schneller als D6L, während D6E noch einmal deutlich langsamer war - ein Effekt der nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Auffällig ist auch der extreme Geschwindigkeitsverlust bei FSA D6A/T26A. Möglicherweise wurde durch die Mutationen so viel Raum im aktiven Zentrum geschaffen, dass Isovaleraldehyd – entgegen der zuvor geäußerten Annahme- inhibitorisch an K85 binden kann. Die wesentlich geringere Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit der Einzelmutante D6A – wodurch weniger freier Raum im aktiven Zentrum entstand - könnte diese Hypothese unterstützen.

Um im nächsten Schritt herauszufinden, welche FSA-Variante am schnellsten das Homoaldolprodukt 3-Hydroxy-2-methylpentanal herstellt, ohne die Konkurrenz einer gekreuzten Aldolreaktion mit dem Nukleophil Aceton unter Bildung von 4-Hydroxyhexan-2-on, wurde ein weiteres *HPTLC-Screening* mit Propanal als alleinigem Substrat durchgeführt (Tabelle 11). Als Kontrolle wurde Deoxy-D-ribose-5-phosphat-Aldolase (DERA) F200I eingesetzt, da sie in gewissem Maße auch Propanal als Substrat akzeptiert (0,4 % Aktivität gegenüber Acetaldehyd)<sup>[125]</sup>. Die DERA F200I ist eine aus *E. coli* stammende Aldolase, welche industriell zur Herstellung einer Partialstruktur des Cholesterinsenkers Atorvastatin verwendet wird<sup>[126]</sup>. Dabei wird aus zwei Äquivalenten Acetaldehyd und einem Äquivalent Chloracetaldehyd das Aldoladdukt (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-trideoxyhexapyranosid hergestellt (Abb. 68.). Die Mutation F200I sorgt dabei für eine zehnfach verbesserte Umsetzung.<sup>[126]</sup>



**Abb. 68.** Synthese von Atorvastatin aus Chloracetaldehyd und Acetaldehyd mithilfe der DERA

Sie wurde in der 96-Well-Platte mit exprimiert, allerdings aus einem anderen Plasmid. Da dieses Plasmid denselben Promotor wie das FSA-Plasmid besitzt, ist von einer vergleichbaren Expressionsrate auszugehen.

**Tabelle 11.** Densitometrische Analyse der FSA D6X/T26X-Bibliothek mit Propanal als alleiniges Substrat ( $\lambda = 650 \text{ nm}$ ). DERA F200I wurde als 100 % relative Aktivität definiert, die schnellste Variante wurde fett markiert.

Line A	Mutation	Farbdichte	Line C	Mutation	Farbdichte
1	D6Q/T26L	10168	1	D6A/T26A	12428
2	D6H/T26L	7092	2	D6L	2012
3	D6L/T26L	2385	3	D6V/T26L	6550
4	D6A/T26V	10373	4	D6E/T26A	12337
5	D6E	5563	5	D6A	8854
6	D6E/T26L	10249	6	D6V/T26V	223
7	D6V/T26A	7608	7	T26V	5250
8	D6H	682	8	D6L/T26A	1079
9	D6A/T26L	1066	9	T26L	7117
10	D6E/T26V	5852	10	D6A/T26I	5792
11	D6L/T26V	643	11	D6P/T26L	4402
12	D6H/T26A	11431	12	D6Q/T26I	6309

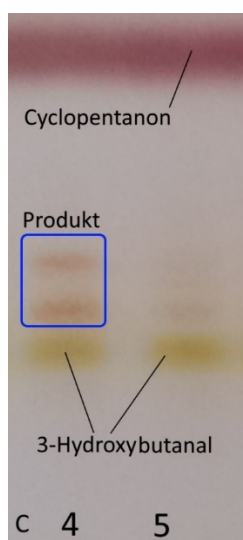
#### *Rescreening*

Position	Mutation	Farbdichte	Farbdichte in % bezogen auf DERA F200I
A1	D6Q/T26L	10366	103
A6	D6E/T26L	9937	99
A12	D6H/T26A	8708	87
C1	D6A/T26A	13584	136
C4	<b>D6E/T26A</b>	<b>14817</b>	<b>148</b>
F1	D6P/T26I	10674	107
F2	Wt	1095	11
H3	DERA	10016	100
	F200I		
A8	D6H	840	8
A4	D6A/T26V	14025	140

Es stellte sich heraus, dass die FSA-Varianten D6A/T26A, D6E/T26A und D6A/T26V eine deutlich höhere Aktivität aufwiesen als die DERA F200I. Weiter fiel auf, dass es diesmal keine hoch aktiven Einzelmутanten gab. Die Mutation T26A scheint jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit für fast alle bisher gefundenen D6-Einzelmутanten stark zu erhöhen. Der Vergleich der Aktivitäten zwischen D6H und D6H/T26A belegt dies eindrucksvoll. Da auch T26L,I und V die Reaktionsgeschwindigkeit bei ausgewählten Mutanten erhöhen, kann davon ausgegangen werden, dass die durch diese Aminosäuren erzeugte hydrophobe Umgebung einen entscheidenden Einfluss darauf hat. T26A sorgt darüber hinaus durch die Erzeugung von mehr Platz für eine Substratbindung in optimaler Position.



Um das mögliche Donorsubstratspektrums der neuen FSA-Mutanten weiter zu untersuchen, wurde die *Hit-Library* auch auf promiskuitive Aktivität mit weiteren Donorsubstraten untersucht. Dafür wurde Butanon als plausibles Homologes von Aceton verwendet sowie das symmetrische 3-Pentanon. Eine 3-Pentanon akzeptierende Variante wäre hoch attraktiv, weil damit die direkte Synthese, von Sitophilur (5-Hydroxy-4-methyl-heptan-3-on), des Pheromons des Reiskäfers (*Sitophilus oryzae* L.) bzw. des Maiskäfers (*Sitophilus zeamais* M.), möglich wäre<sup>[127]</sup>. Zusätzlich wurden Cyclohexan und Cyclopentan getestet, da diese aufgrund ihrer starren Molekülstruktur einen stärkeren Dipol besitzen und somit besser wasserlöslich sind als 3-Pentanon. Trotzdem war die Löslichkeit all dieser Ketone in Wasser eng begrenzt, weswegen sie nur in deutlich geringeren Konzentrationen als Aceton wirksam werden können. Hinsichtlich der zu erwartenden hohen  $K_m$ -Werte war daher von einer wesentlich geringeren Aktivität auszugehen. Aus diesem Grunde wurde statt Propanal das reaktivere 3-Hydroxybutanal als Akzeptorsubstrat verwendet. Das so entstehende Produkt ist in der Lage, einen 6-Ring auszubilden, was die Synthesereaktion darüber hinaus energetisch begünstigt. Außerdem entsteht dabei kein Propanal-Homodimer, welches sowohl die dünnschichtchromatographische Auswertung erschwert als auch eine substratverbrauchende Konkurrenzreaktion darstellt. Um das Löslichkeitsproblem zu umgehen, wurde DMSO als Cosolvenz getestet. Da dieses jedoch auf der DC-Platte mitwandert, die  $R_f$ -Werte verändert und zudem das Anfärben partiell verhindert, war dessen Verwendung unpraktikabel. Eine weitere Veränderung war zudem notwendig, weil sich die unpolaren Donorsubstrate möglicherweise in der ebenfalls unpolaren Zellmembran lösen könnten und so der Reaktion nicht zur Verfügung stehen. Aus diesen Gründen wurde auf die Verwendung ganzer Zellen verzichtet. Diese wurden daher nach der *fsa*-Expression in TEA-Puffer resuspendiert und mittels Zugabe von Lysozym und Benzonase lysiert. Zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten wurde ebenfalls DTT hinzugegeben. Darauf erfolgte eine Hitzedenaturierung bei 70 °C, um einen Großteil der zelleigenen *E. coli*-Proteine zu denaturieren und mittels Zentrifugation abzutrennen<sup>[69]</sup>. Das so gereinigte Zelllysate wurde in einer 96-Well-Platte mit einer 3-Hydroxybutanal-Lösung (20 mM) versetzt und nach mehreren Stunden Reaktionsdauer dünnschichtchromatographisch analysiert (Abb. 69., Tabelle 12.). Für Butanon, Cyclohexanon und 3-Pentanon konnten keine neuen Produktpots entdeckt werden. Bei Cyclopentanon wurde eine geringe Produktbildung detektiert (Abb. 69.).



**Abb. 69.** Dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktion von FSA D6E/T26A (4) und D6A (5) mit Cyclopentanon und 3-Hydroxybutanal. Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 10:1, angefärbt mit Anisaldehyd.

Aus diesen Gründen wurde das Experiment mit einer größeren Enzymmenge wiederholt. Dafür wurden mithilfe der Masterplatte drei 96-Well-Deepwellplatten inokuliert. Nach Genexpression wurden die Zellen in einer Platte zusammengeführt, wie oben lysiert und durch Hitzeaufreinigung von anderen Proteinen befreit. Die Reaktion wurde nach 6 Stunden Reaktionszeit bei 40 °C mittels *HPTLC* analysiert. Durch die höhere Reaktionstemperatur sollte eine größere Produktbildung erreicht werden.

**Tabelle 12.** Densitometrische Analyse der FSA D6X/T26X-Bibliothek mit Cyclopentanon und (3*S*)-3-Hydroxybutanal als Substrat bei 600 nm. D6H wurde als 100 % relative Aktivität definiert, die schnellste Variante wurde fett markiert.

Line A	Mutation	Farbdichte	Line C	Mutation	Farbdichte
1	D6Q/T26L	170	1	D6A/T26A	2750
2	D6H/T26L	343	2	D6L	2985
3	D6L/T26L	0	3	D6V/T26L	0
4	D6A/T26V	330	4	D6E/T26A	2590
5	D6E	416	5	D6A	285
6	D6E/T26L	434	6	D6V/T26V	0
7	D6V/T26A	3155	7	T26V	696
8	D6H	2654	8	D6L/T26A	4976
9	D6A/T26L	290	9	T26L	2146
10	D6E/T26V	350	10	D6A/T26I	2388
11	D6L/T26V	1809	11	D6P/T26L	943
12	D6H/T26A	1448	12	D6Q/T26I	3462

#### Rescreening

Position	Mutation	Farbdichte	Farbdichte in % bezogen auf D6H
A7	<b>D6V/T26A</b>	<b>11376</b>	<b>108</b>
A8	D6H	10527	100
A11	D6L/T26V	8418	80
A12	D6H/T26A	5408	51
C1	D6A/T26A	5240	50
C2	D6L	6357	60
C4	D6E/T26A	9545	91
C8	D6L/T26A	10115	96
E1	D6H	10234	97
E3	D6N <sup>[128]</sup>	6800	65

Im Hinblick auf die verhältnismäßig große Proteinmenge und die lange Reaktionszeit bei erhöhter Temperatur ist davon auszugehen, dass die Reaktion bei den Proben D6V/T26A, D6H, D6E/T26A, D6L/T26A vollständig abgelaufen ist, so dass keine Differenzierung der Aktivitätsunterschiede möglich war. Die Häufung der Mutation T26A in den aktiven Hits spricht jedoch dafür, dass sie vermutlich einen wichtigen Beitrag zur Aktivitätssteigerung leistet.

Zur weiteren Differenzierung der Aktivität der genannten Variante wurde D6V/T26A, D6H, D6E/T26A und D6L/T26A als lyophilisiertes Protein verwendet. Weil mit der Variante D6L/T26A keine starke Produktbildung gefunden wurde, wurde diese in weiteren Experimenten nicht mehr berücksichtigt. Zum Aktivitätsvergleich wurden D6H, D6L/T26A, D6E/T26A und die eher wenig aktive Mutante D6E als Kontrolle jeweils in einem *Eppendorf*-Gefäß exprimiert, lysiert und bei 70 °C aufgereinigt. Diesmal erfolgte die HPTLC-Analyse schon nach einer Stunde. Gleichzeitig wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Wells mittels *Bradford* bestimmt und in die Auswertung mit einbezogen (Tabelle 13.).

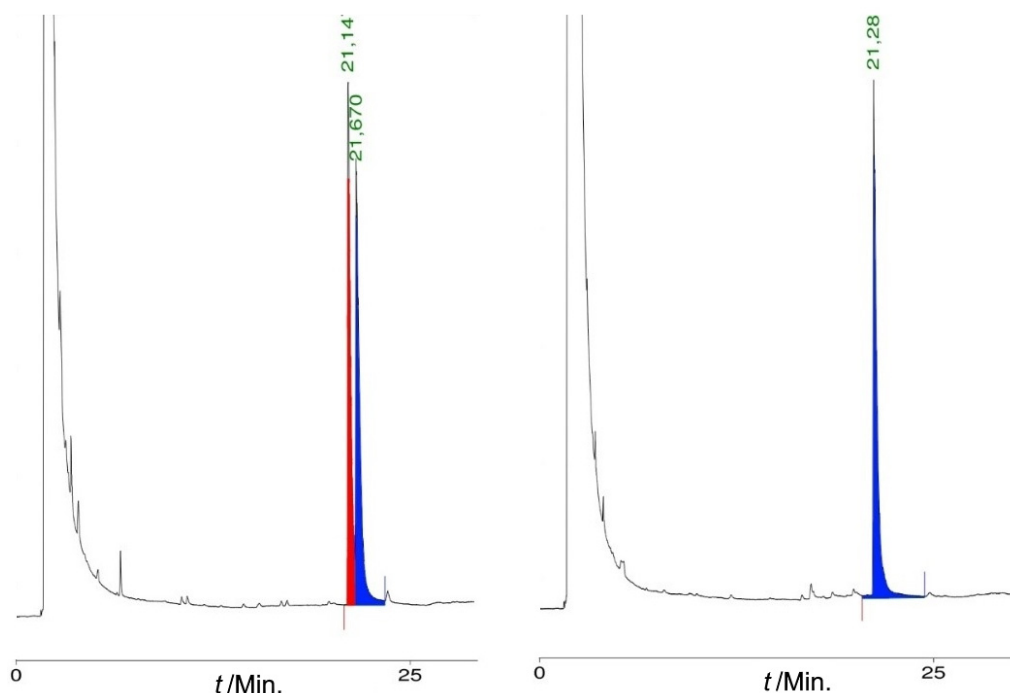
**Tabelle 13.** Densitometrische Analyse der besten FSA-Varianten mit Cyclopentanone und (3*S*)-3-Hydroxybutanal als Substrat bei 600 nm. D6H wurde als 100 % relative Aktivität definiert, die schnellste Variante wurde fett markiert.

Position	Mutation	Fläche	Aktivität in % bezogen auf D6H
C4	<b>D6E/T26A</b>	<b>13322<sup>[a]</sup></b>	<b>329</b>
C8	D6L/T26A	9758 <sup>[b]</sup>	241
A5	D6E	2186 <sup>[c]</sup>	54
A8	D6H	40445 <sup>[d]</sup>	100

a = 0,94 mg/ml FSA, b = 0,43 mg/ml FSA, c = 1,06 mg/ml FSA, d = 1,09 mg/ml FSA

Offensichtlich bewirkt die Mutation T26A bei der FSA D6E eine Steigerung der Aktivität für Cyclopentanone um den Faktor 6! Auch in Kombination mit D6L scheint die Aktivität verbessert zu sein. Dies ist möglicherweise auf mehr Platz im aktiven Zentrum sowie auf eine unpolare Umgebung zurückzuführen.

Das für die *Screenings* benötigte 3-Hydroxybutanal wurde durch eine einfache Reduktion von 4,4-Dimethoxybutan-2-on mit Natriumborhydrid<sup>[129]</sup> und anschließender Hydrolyse der acetalischen Methoxygruppen gewonnen. Da eine Katalyse mittels Salzsäure zu Eliminierungsprodukten führte, welche eine dünnschichtchromatographische Analyse der nachfolgenden enzymatischen Reaktion mit den verschiedenen Ketonen erschwerte, wurde mit kochendem, destilliertem Wasser unter Rückfluss geschützt<sup>[130]</sup>. Die so enthaltene Lösung konnte darauf direkt eingesetzt werden. Da mit dem racemischen Aldehyd bei der FSA-katalysierten Reaktion mit den Ketonen ein Diastereomergemisch entsteht, was auf der Dünnschichtchromatographie-Platte zu zwei verschiedenen Spots mit ähnlichem Laufverhalten führte, was die densitometrische Analyse behindern könnte, wurde alternativ mithilfe von - in Leitungswasser suspendierter - Supermarkthefer (*Saccharomyces cerevisiae*) 4,4-Dimethoxybutan-2-on selektiv zu (2*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol in präparativem Maßstab reduziert. Saccharose diente hierbei als Nahrungsquelle für die Hefe, während festes CaCO<sub>3</sub> ein Übersäuern der Lösung verhinderte, ohne den osmotischen Druck zu erhöhen. Die Enantiomerenreinheit des so hergestellten Dimethoxybutanols wurde mittels chiraler GC nachgewiesen (Abb. 70.).

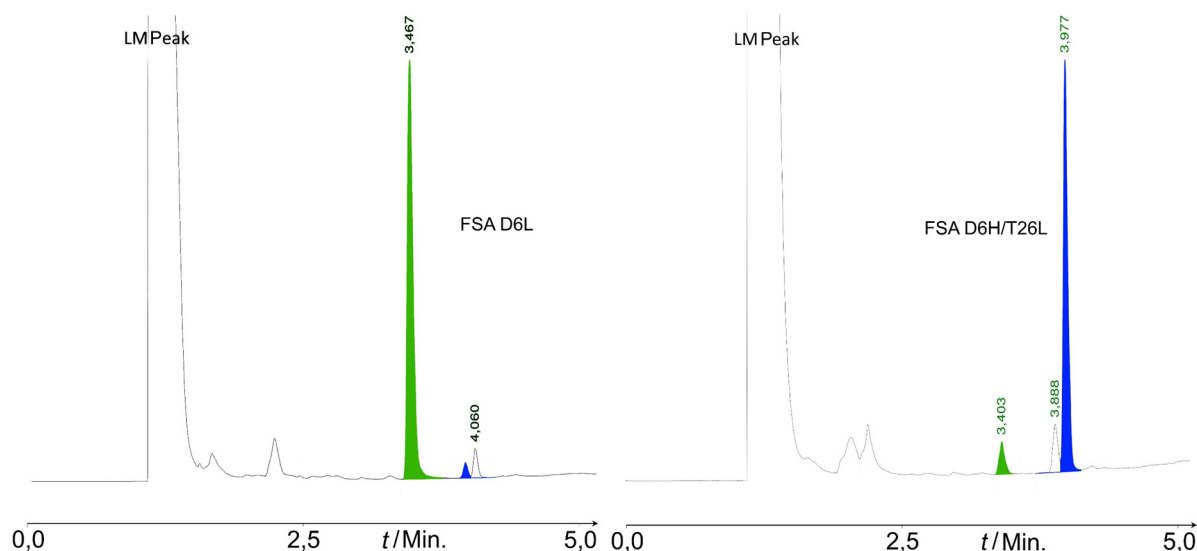


**Abb. 70.** GC-Analyse von racemischen 4,4-Dimethoxybutan-2-ol und durch Hefereduktion erhaltenem, enantiomerenreinem (2*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol

### 3.5. Gaschromatographische Untersuchungen ausgewählter FSA-Varianten

Die so durchgeführten Screenings haben verschiedene FSA-Varianten identifiziert, die verschiedene neue Substrate umsetzen können. Mittels *HPTLC* war es möglich, ihre Produktbildungsgeschwindigkeit zu bestimmen. Aus dem Ergebnis lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion verschiedener Aminosäuren an den mutierten Positionen ziehen. Um zusätzliche Informationen über die Aminosäurefunktionen zu sammeln, war es darüber hinaus wichtig festzustellen, welche FSA-Varianten in Gegenwart von Aceton und Propanal selektiv nur 4-Hydroxyhexan-2-on oder nur 3-Hydrox-2-methylpentanal bilden (für Produktaufklärung siehe Kapitel 3.6 Synthese). Dazu wurden die nach optischer Betrachtung der DC-Platten die in ihrer Produktbildung selektivsten Mutanten ausgewählt und mittels Gaschromatographie untersucht. Dies hatte den Vorteil, einerseits die *HPTLC*-Ergebnisse partiell mit einer anderen Methode zu validieren, andererseits werden beide Produkte mit der gleichen Methode (Flammenionisationsdetektor) unter gleichen Bedingungen analysiert. Bei der densitometrischen Analyse hingegen könnten die verschiedenen Produkte eventuell unterschiedlich starke Farbtiefe entwickeln, oder eine andere Farbe ausbilden, so dass für ihre Analyse eine andere Wellenlänge von Nöten ist. Ist letztere nicht optimal gewählt, könnte eine falsche relative Produktkonzentration angezeigt werden.

Für die GC-Analyse wurden die *fsa*-Mutanten in *Eppendorf*-Gefäßen exprimiert. Das Nährmedium wurde entfernt und die Zellen mit TEA-Puffer, Aceton und Propanal versetzt. Nach einer Stunde bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt und ein Teil der Reaktionslösung mit Methanol vermischt, um eventuell gelöste Proteine zu denaturieren. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Methanol-Wassermischung gaschromatographisch analysiert (Abb. 71.) und Ausgewertet (Tabelle 14.).

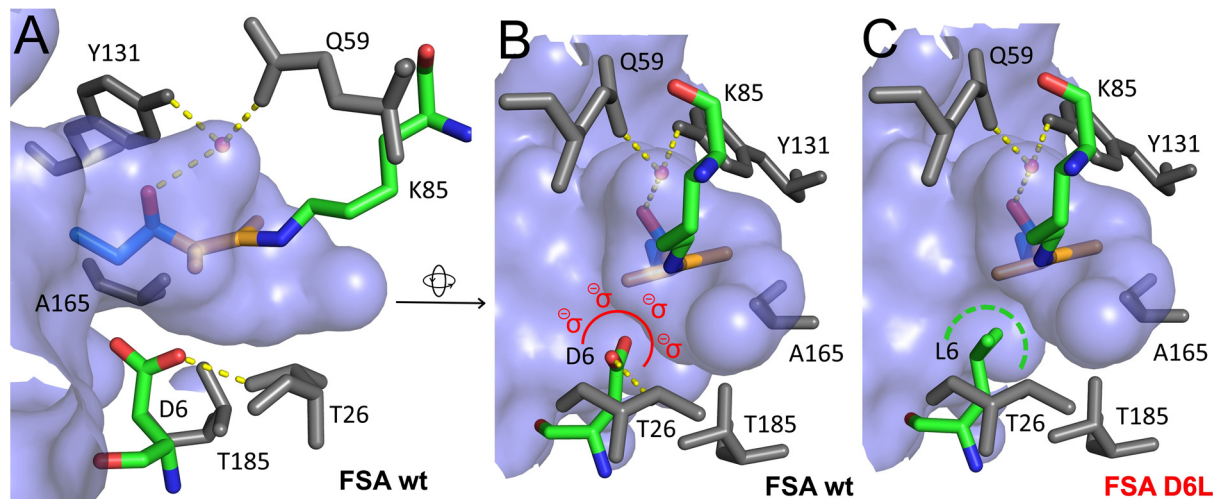


**Abb. 71.** Gaschromatographische Untersuchung der Produktbildung von FSA D6L und FSA D6H/T26L mit Aceton und Propanal als Substrat nach 1 h bei 37 °C. Der Peak für 4-Hydroxyhexan-2-on ist grün, der für 3-Hydrox-2-methylpentanal blau eingefärbt.

**Tabelle 14.** GC-Analyse verschiedener FSA-Varianten, **blau**= selektiv für 3-Hydrox-2-methylpentanal, **grün** = selektiv für 4-Hydroxyhexan-2-on.

FSA-Varianten	Gesamtaktivität in % bezogen auf beide Produkte	Quotient von Hauptprodukt/Nebenprodukt
D6L	100	18,2
D6H	44	28,9
D6L/T26A	39	17,0
D6L/T26V	17	5,1
Wt	7	1,6
D6A/T26L	78	8,3
D6E/T26L	77	4,2
D6E	73	1,0
D6A/T26V	71	7,1
T26L	60	3,9
D6H/T26L	48	10,1
D6P/T26I	45	7,0
D6A/T26I	36	11,6
D6P/T26L	32	10,6
D6V/T26L	30	2,7
D6E/T26V	28	3,3
T26V	25	3,6
D6Q/T26I	17	>99

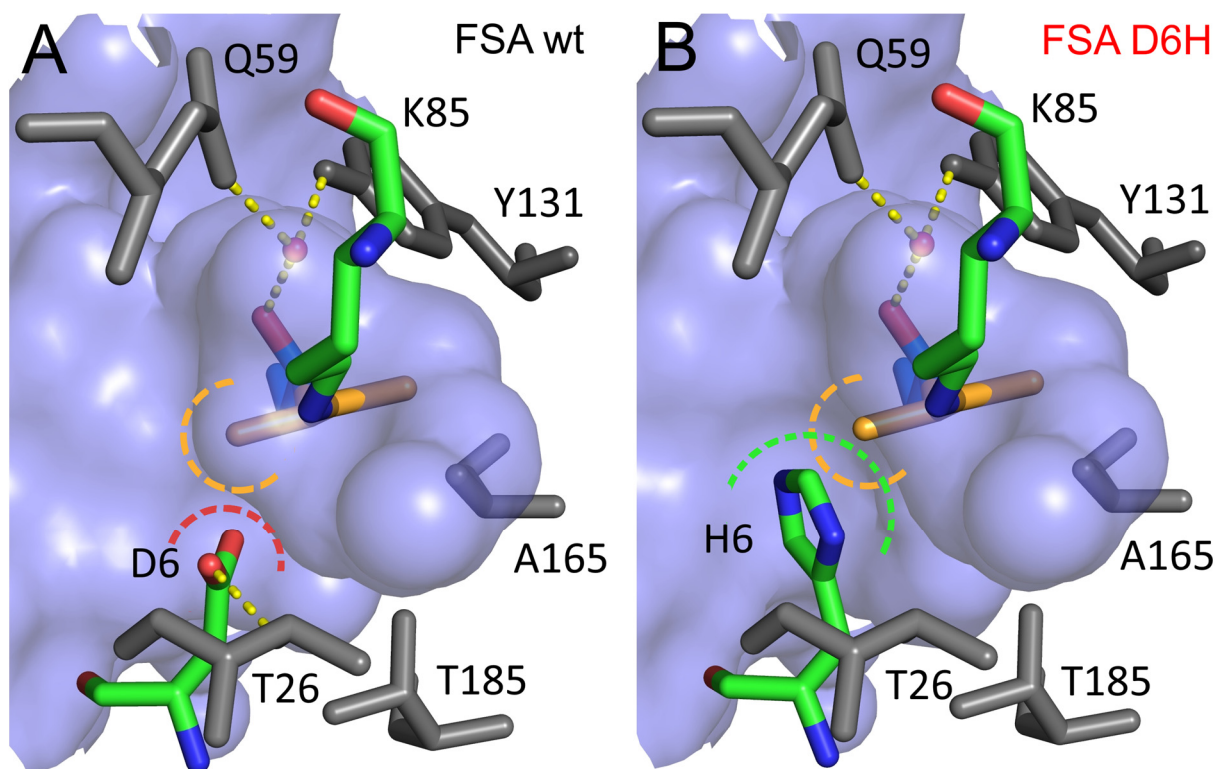
Diese gefundenen Selektivitäten der FSA-Varianten sind insofern bemerkenswert, da Aceton in 16-fach höherer Konzentration als Propanal eingesetzt wurde. Bezieht man dies in die Daten von Tabelle 14 ein, ist davon auszugehen, dass alle Varianten außer D6H selektiver für Propanal sind. Die Reaktivität von Variante D6A/T26I mit Propanal im Vergleich zu Aceton als Donor beträgt also ca. das 185-fache. Da es in der Natur nicht nur darauf ankommt schnelle, sondern auch hoch selektive Enzyme zu entwickeln, verwundert es nicht, dass die mittels *3DM-Bio-Product* vorhergesagte FSA-Variante D6A/T26I die zweit-selektivste und D6A/T26L die mit dem besten Selektivitäts/Geschwindigkeitsverhältnis ist. Bei der weiteren Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass ein Großteil der gefundenen besonders aktiven Mutanten an Position 6 die Aminosäuren Histidin, Leucin, Glutaminsäure oder Alanin tragen. Lediglich die Mutante D6V/T26A besitzt noch eine nennenswerte Geschwindigkeit für den Umsatz mit Aceton. Da nicht davon auszugehen ist, dass der Katalysemechanismus beeinflusst wurde, ist anzunehmen, dass der Geschwindigkeitsunterschied der Varianten vornehmlich auf eine Verbesserung der Substratbindung zurückzuführen ist. Um dies zu verstehen, wurde ein *PyMOL*-Modell mit Butanon als Donor und Propanal als Akzeptorsubstrat konstruiert (Produkt: 4-Hydroxy-3-methylhexan-2-on). Butanon repräsentiert hierbei eine Kombination aus Aceton und Propanal, um mit einem einzigen Substratanalogon beide Substanzen im Modell darstellen zu können. Für die Variante D6L wurde die polare Aminosäure Asparaginsäure durch die unpolare Aminosäure Leucin ersetzt (Abb. 72.). In Kontakt mit dessen unpolarer Seitenkette im aktiven Zentrum können die unpolaren Substrate Aceton und Propanal besser binden, was die verbesserte katalytische Aktivität von FSA D6L erklärt. Da D6L 18-mal mehr 4-Hydroxyhexan-2-on herstellt als 3-Hydroxy-2-methylpentanal, das dafür nötige Substrat Aceton jedoch in 16-fach höherer Konzentration vorlag, ist davon auszugehen, dass D6L beide Substanzen vergleichbar gut akzeptiert.



**Abb. 72.** Aktives Zentrum der FSA mit gebundenem 4-Hydroxy-3-methylhexan-2-on in zwei verschiedenen Orientierungen (A, B/C). Das Aceton/Propanal repräsentierende Substratmodell Butanon ist orange dargestellt, der Akzeptorsubstratteil blau. Während D6 durch seine **partielle Negativladung** die gute Bindung eines hydrophoben Substrates verhindert, sorgt die Mutation D6L (C) für eine **hydrophobe Umgebung**, wodurch die Bindung von Aceton oder Propanal begünstigt wird. Bei der virtuellen Mutantenerzeugung wurde das Rotamer der Aminosäure gewählt, welche die Vorzugsconfiguration darstellt. Die Oberfläche der FSA ist bläulich eingefärbt, die Perspektive ist aus dem Inneren des Proteins.



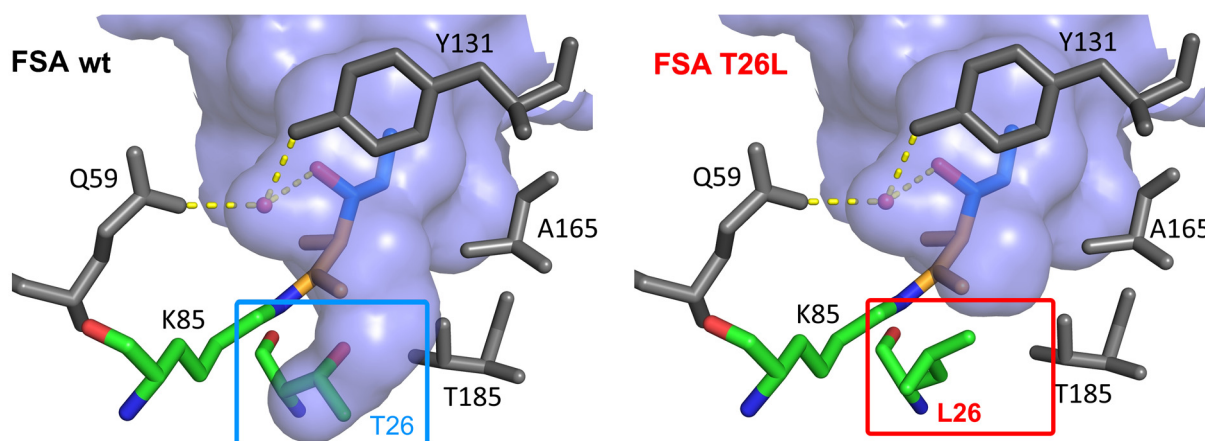
Die Variante D6V scheint aufgrund ihrer im Vergleich zur D6L früher verzweigten Seitenkette das Platzangebot im aktiven Zentrum zu stören, was nur eine geringe Aktivität ermöglicht (Abb. 73.). Lediglich durch die platzschaffende Mutation T26A scheint eine Kombination gegeben, die die Verhältnisse im aktiven Zentrum nicht stört, wodurch eine aktive Mutante entsteht. Bei der Betrachtung des Modells von D6H fällt auf, dass der Histidinrest das aktive Zentrum so verkleinert, dass zwar Aceton noch sehr gut hineinpasst, für das einseitige größere Propanal jedoch keinen ausreichenden Platz lässt, was die Selektivität für Aceton erklären würde. Da die Histidin-Seitenkette aufgrund ihrer Aromatizität und weichen  $\pi$ -Elektronenwolke auch unpolare Kontakte ermöglicht, ist die Bindung von Aceton begünstigt. Diese relativ enge, unpolare Tasche kann Aceton offenbar so gut binden, dass dadurch die hohe Umsatzgeschwindigkeit in den verschiedenen *HPTLC-Screenings* zwanglos erklärt werden kann.



**Abb. 73.** Aktives Zentrum der FSA sowie FSA D6H mit 4-Hydroxy-3-methylhexan-2-on; die Methylgruppe des Propanal-Teils des Substrates und das Histidin stehen im sterischen Konflikt zueinander

Dass die Kombination D6H/T26L diese Selektivität umkehrt, ist nur durch das Entstehen einer für Propanal passenden neuen Tasche erklärbar, welche mithilfe der verwendeten *PyMOL*-Version nicht visualisiert werden konnte. Da D6E eine flexiblere Seitenkette hat als Histidin, konnte auch dafür kein rationales Modell erstellt werden, so dass die Interpretation dieser Mutante schwer möglich ist. Bei der Betrachtung der Daten des Selektivitätsexperiments fällt auf, dass die Mutationen T26L und T26V in der Lage sind, die Selektivität der Mutanten D6E, D6A, D6L, D6H und des Wildtyps stark von 4-Hydroxyhexan-2-on zu 3-Hydroxy-2-methylpentanal zu verschieben. Im *PyMOL*-Modell wird ersichtlich, dass die Mutation T26L den Platz am Ende des aktiven Zentrums so stark beschränkt, dass Aceton bzw. Butanon im Modell mit seiner in das aktive Zentrum zeigenden Methylgruppe aus sterischen Gründen nur noch sehr schlecht binden kann (Abb. 74.).



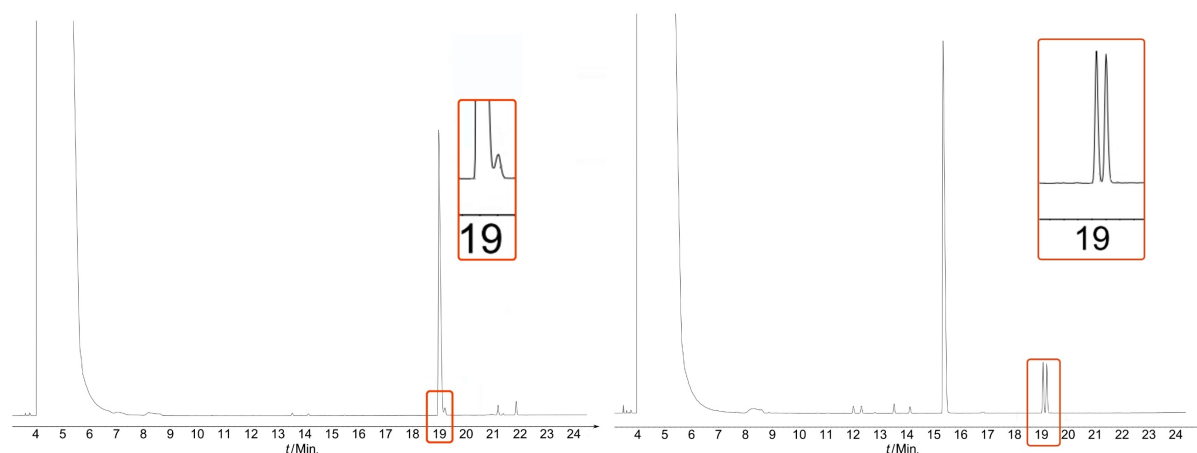


**Abb. 74.** Aktives Zentrum der FSA sowie FSA T26L mit 4-Hydroxy-3-methylhexan-2-on<sup>[75]</sup>

Da das Van-der-Waals-Volumen von Valin  $105 \text{ \AA}^3$  beträgt, während Threonin lediglich ein Volumen von  $93 \text{ \AA}^3$  besitzt<sup>[131,132,132]</sup>, kann ein ähnlich abgeschwächter Effekt durch die Mutation T26V gegeben sein (z. B. D6L vs D6L/T26V vs D6L/T26A). T26I scheint die Mutanten D6Q und D6A aus dem gleichen Grund sehr selektiv zu machen. Da die alleinige Mutation T26I genauso wenig aktiv ist wie die Kombinationen D6L/T26I und D6E/T26I, ist davon auszugehen, dass aufgrund der sperrigen Struktur von Isoleucin nur Aminosäurekombinationen in Frage kommen, welche gleichzeitig Platz für die Verzweigung des Isoleucins schaffen (D6A/T26I). Die für die Reaktion von Isovaleraldehyd und Aceton gefundenen Mutanten enthalten ebenfalls keine T26L/I,V Kombinationen. Da Isovaleraldehyd ein schlechteres Elektrophil als Propanal darstellt, ist die gute Bindung von Aceton noch stärker geschwindigkeitsbestimmend, so dass D6H und D6L die mit Abstand schnellsten Varianten sind. Interessant ist auch, dass T26A zwar die Selektivität aufhebt, aber trotzdem bei D6E und D6A die Reaktionsgeschwindigkeit für 3-Hydroxy-2-methylpentanal erhöht. Die Reaktionsgeschwindigkeit von D6H wird zwar ebenfalls erhöht, dies ist aber vermutlich darauf zurückzuführen, dass T26A hier überhaupt erst eine Bindung ermöglicht. Dass D6A/T26A eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit mit Aceton und Propanal, jedoch nicht mit Aceton und Isovaleraldehyd aufweist, könnte daran liegen, dass Isovaleraldehyd an K78 in der größeren Enzymtasche inhibitorisch bindet und dabei die produktive Bindung von Aceton blockiert. Die mittels 3Dm-Biopredict

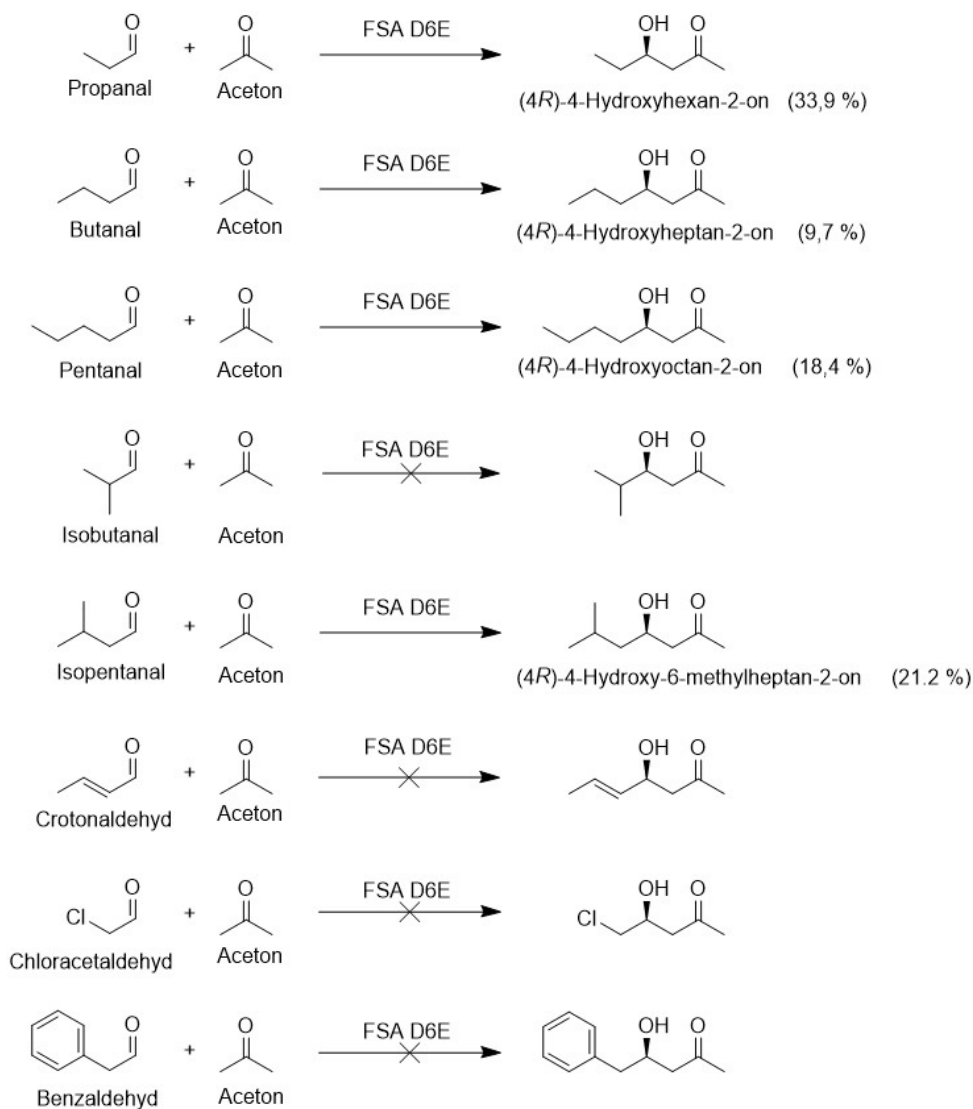
### 3.6. Synthese

Um die Syntheseleistung der gefundenen Varianten zu beurteilen und insbesondere deren Enantioselektivität zu überprüfen, wurden mit diversen FSA-Varianten verschiedene präparative Reaktionen durchgeführt. Da D6H als beste Variante für Reaktionen mit Aceton bereits, in der Literatur bewertet wurde<sup>[77]</sup>, konnte auf einen präparativen Ansatz verzichtet werden. Daher wurde zunächst eine Reaktion mittels D6E und Aceton sowie Propanal als Substrat durchgeführt, da für diese Variante kein nachvollziehbares Katalysemodell existierte. Dafür wurde zunächst lyophilisierte FSA D6E in TEA-Puffer gelöst, welcher 10 % Aceton enthielt, um dessen erwartet schlechten  $K_m$ -Wert auszugleichen. Nun wurde DTT als Oxidationsschutz sowie frisch destilliertes Propanal hinzugegeben. Nach 3 Tagen bei RT wurde die Produktbildung per Dünnschichtchromatographie bestätigt. Die nicht reagierten Substrate Aceton und Propanal wurden evaporiert. Ein Extraktionsversuch mit Ethylacetat scheiterte daran, dass sich durch das Protein ein großvolumiger Schaum zwischen den Phasen bildete, der eine Phasentrennung unmöglich machte und durch die Zugabe von Salz, Ultraschall oder Unterdruck nicht gebrochen werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Lösung zunächst mit Ethanol versetzt und in der Kälte inkubiert, um ein Ausfällen des Proteins zu erzielen. Nach Entfernen des Präzipitates wurde das gesamte Lösungsmittel evaporiert. Zurück blieb eine orange, zähe Masse, aus der durch Extraktion mit Chloroform Spuren von 4-Hydroxyhexan-2-on nachgewiesen werden konnte. Eine Wiederholung des Experimentes, bei der das Ausfällen mit Aceton oder Methanol statt mit Ethanol stattfand, ergab kein anderes Ergebnis, genauso wenig wie das Herabsetzen der Temperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Da dieses Verfahren offenbar unpraktikabel war, wurde eine neue Reaktion angesetzt. Diesmal wurden statt lyophilisierter FSA ganze, lyophilisierte Zellen verwendet. Um diese nicht durch einen nicht-natürlichen osmotischen Druck zu schädigen, wurde die Reaktion in doppelt konzentriertem PBS-Puffer angesetzt. Nach 4 Tagen bei Raumtemperatur wurden die Zellen per Zentrifugation entfernt und das Produkt mittels Diethylether extrahiert. Nach *Solvens*-Evaporation wurde es mittels NMR analysiert und identifiziert. Eine gaschromatographisch Untersuchung mit einer chiralen Säule wurde durchgeführt, um die Enantiomerenreinheit der Reaktion zu untersuchen, was einen *ee*-Wert von 95,72 % lieferte. Als Vergleich diente das mit 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on verunreinigte, aber racemische 4-Hydroxyhexan-2-on (vergleiche Gasstrommethode) (Abb. 75.).



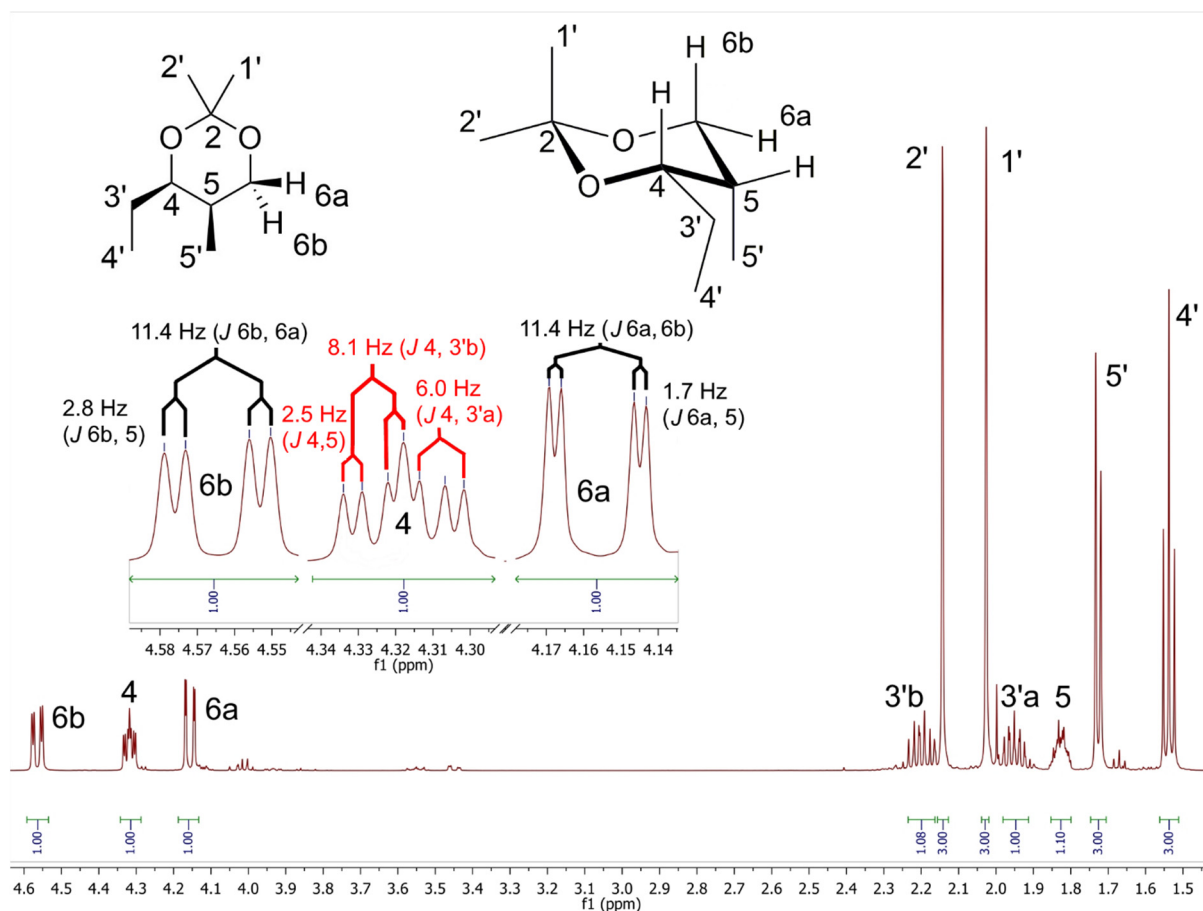
**Abb. 75.** Gaschromatographische Analyse von mittels FSA D6E hergestelltem 4-Hydroxyhexan-2-on (links, *Rt*: 19 Min.) im Vergleich zu chemisch hergestelltem 4-Hydroxyhexan-2-on, welches mit 3-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (*Rt*: 15,4 Min.) verunreinigt war.

Im Rahmen der Screeningsubstratsuche wurde diese präparative Reaktion mit den alternativen Elektrophilen Butanal, Pentanal, Isobutanal, Isopentanal, Crotonaldehyd, Chloracetaldehyd und Benzaldehyd wiederholt (Abb. 76.). Die erwarteten Produkte konnten jedoch nur aus den Reaktionen mit Butanal, Pentanal und Isopentanal isoliert und charakterisiert werden.



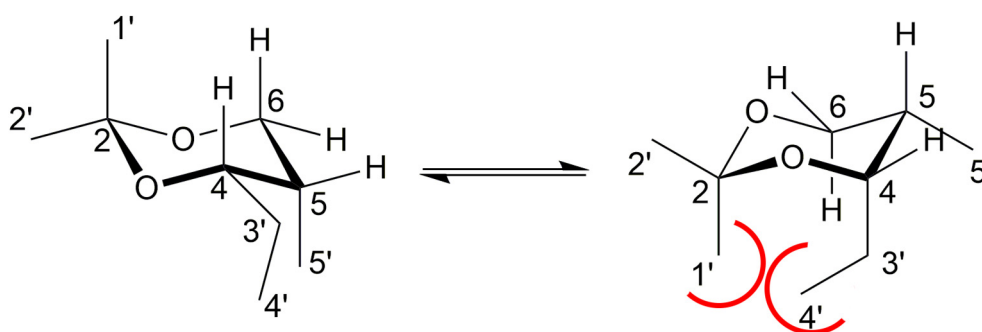
**Abb. 76.** Mit FSA D6E enthaltenden *E. coli*-Zellen durchgeführte, präparative Reaktionsversuche mit Aceton als Nukleophil und verschiedenen Aldehyden als Elektrophil.

Als nächstes wurde Propanal mit der FSA-Variante D6A/T26I umgesetzt. Um hier das Extraktionsproblem zu umgehen, wurde die Reaktionslösung mit Proteinase K und Calciumchlorid als ihrem Cofaktor versetzt, um die FSA zu hydrolysieren. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natriumhydrogencarbonat auf 7 eingestellt, um bei der für die Hydrolyse notwendigen Temperatur von 55 °C keine Eliminierungsreaktionen zu provozieren. Nachdem die Lösung klar wurde, konnte sie vorsichtig mit Ethylacetat extrahiert werden. Das anschließende Evaporieren des Lösungsmittels musste mit Vorsicht vonstattengehen, da  $\beta$ -Hydroxyketone/aldehyde durch die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke in nicht protischer Umgebung volatiler sind, als von der Struktur her anzunehmen wäre. Da das nach dem Evaporieren zurückbleibende Öl per NMR nicht eindeutig charakterisiert werden konnte, wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels Natriumborhydrid reduziert<sup>[129]</sup>. Das so entstandene Diol konnte per NMR nachgewiesen werden. Um die Enantiomerenreinheit sowie die absolute Konfiguration zu bestimmen, wurde das Diol mit Aceton und *para*-Toluolsulfonsäure als cyclisches Acetal geschützt<sup>[133]</sup>. Dabei wurde 2,2-Dimethoxypropan in 2,8-facher stöchiometrischer Menge zugesetzt, da dieses mit dem entstehenden Wasser reagiert und dabei nur in Methanol und das schon vorhandene Aceton zerfällt. Nachdem der Säurekatalysator mit Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert worden war, so dass es zu keiner Rückreaktion kommen konnte, wurde das Produkt per Diethylether-Extraktion isoliert. Nach Evaporation des Lösungsmittels konnte das Produkt per NMR-Analyse identifiziert werden (Abb. 77.). Wegen der Signalüberlagerungen der Protonen -H3'a, -H3'b und -H5 in reinem  $\text{CDCl}_3$  wurde 30 % deuteriertes Benzol hinzugegeben, um diese durch Anisotropieeffekte zu entzerren.



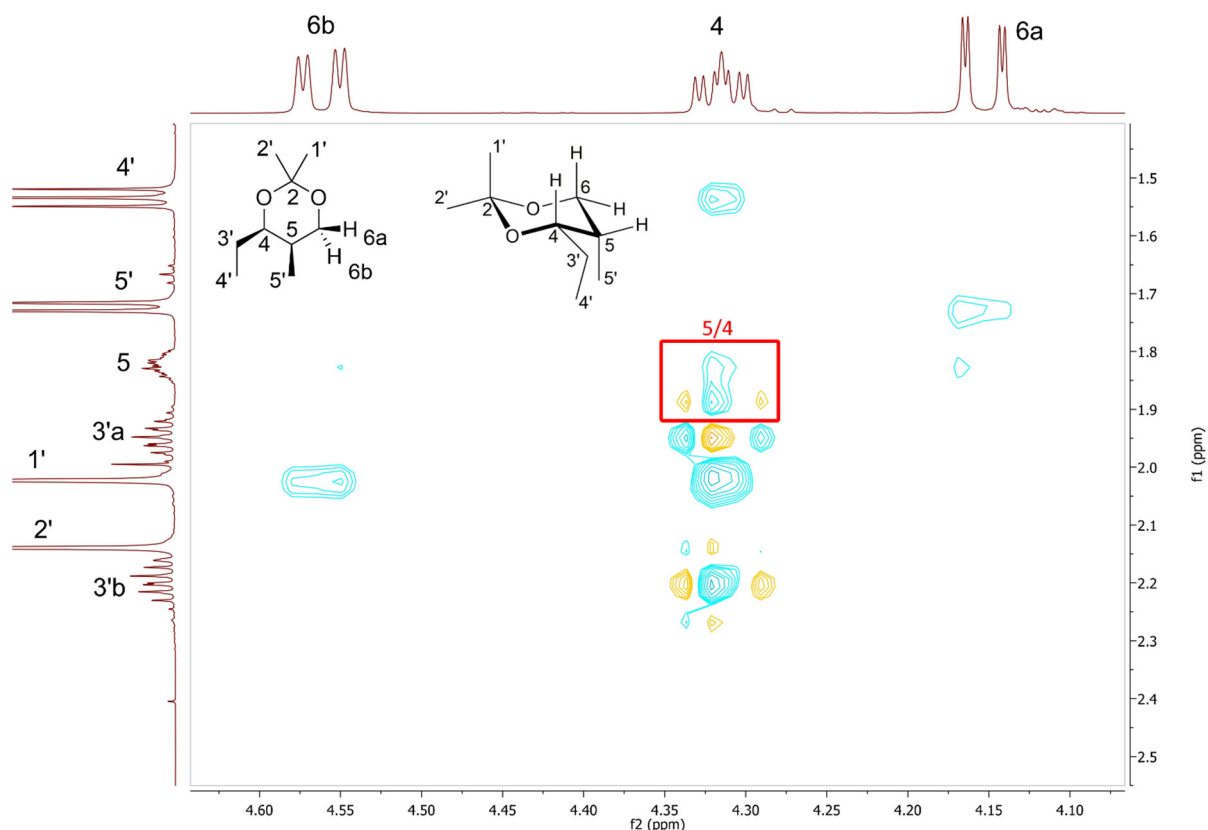
**Abb. 77.**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 30 %  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von (4R,5R)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan, die diastereotopen Protonen von 3' wurden willkürlich mit a und b benannt.

Ausgehend von der Prämisse, dass sich das Stereozentrum an Position 4 (ehemaliges Aldehyd-Carbonyl) nicht geändert hat, kann anhand der Abwesenheit von großen Kopplungskonstanten im Signal des Protons 4 (4.32 ppm,  $J(4, 5) = 2.5$ ,  $J(4, 3'b) = 8.1$ ,  $J(4, 3'a) = 6.0$  Hz, Abb. 77.) davon ausgegangen werden, dass es sich in *syn*-Position zu Proton 5 (1.83 ppm, m) befindet. Dies ist nur möglich, wenn sich das Stereozentrum an Position 5 durch die Mutation nicht umgekehrt hat. Da jedoch die Kopplungskonstanten von 5 zu 6 sehr klein sind (1.7, 2.8 Hz), kann man daraus die natürliche *R*-Konfiguration ablesen. Würde Proton 5 axial im Ring stehen, hätte es einen Bindungswinkel von nahezu 180 Grad zum axial stehenden Proton an Position 6, was in einer entsprechend großen Kopplungskonstante resultieren würde. Da dem aber nicht so ist, kann wahrscheinlich von einer äquatorialen Position von Proton 5 ausgegangen werden, woraus sich die absolute Konfiguration an dieser Position ergibt (*R*-Konfiguration). Aus Abb. 78. geht hervor, dass die Ringform, bei welcher die Ethylgruppe in äquatorialer Position ( $^2C_5$ -Form) liegt, die stabilere ist da es sonst zu sterischen Wechselwirkungen mit der Methylgruppe an C2 kommt ( $^5C_2$ -Form).



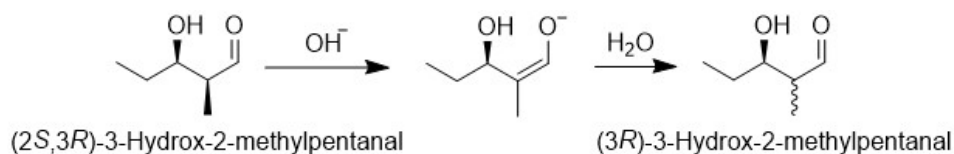
**Abb. 78.** (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan in der bevorzugten  $^2C_5$ -Form (links), sowie in der durch sterischen Konflikt zwischen der Methylgruppe 1' und der Ethylgruppe 3' nicht bevorzugten  $^5C_2$ -Form (rechts)

Betrachtet man zusätzlich das NOESY-Spektrum der Verbindung, wird die *syn*-Position von Proton 4 und 5 zueinander durch ihr Kreuzsignal sowie der Abwesenheit desselbigen von 5'/4 zusätzlich bestätigt (Abb. 79.).



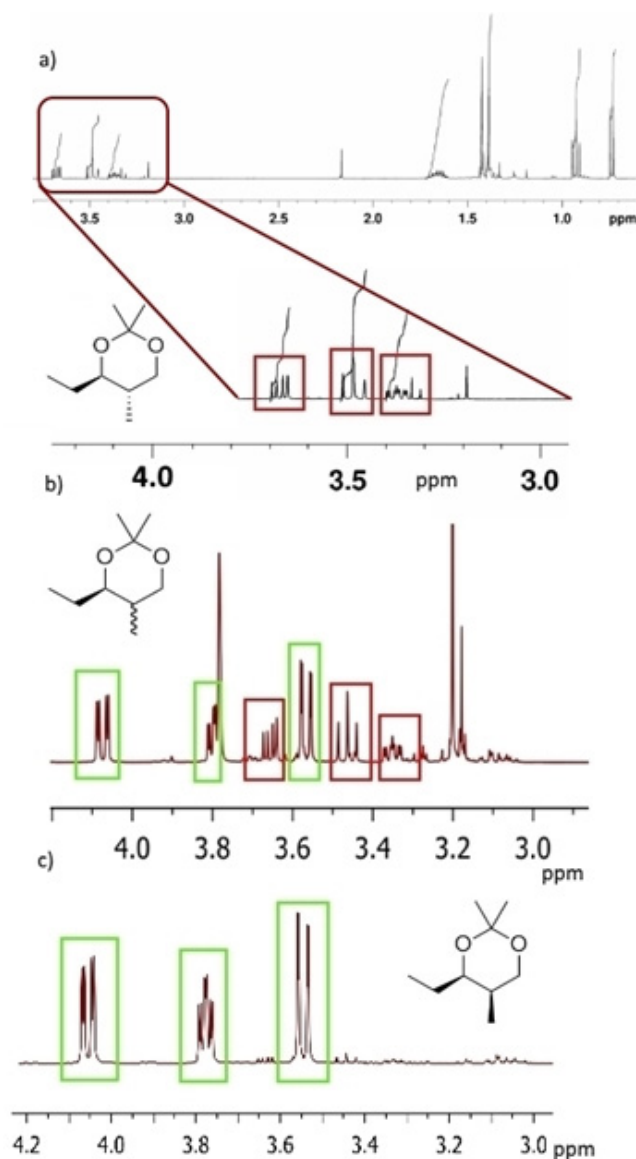
**Abb. 79.** NOESY-Spektrum von (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan. Die Kopplung von Proton 4 und 5 als Beweis für ihre *syn*-Positionierung zueinander wurde rot umrandet.

Die Konfiguration ist also (2*S*,3*R*)-3-Hydrox-2-methylpentanal bzw. (2*R*,3*R*)-2-Methylpentan-1,3-diol. Um zusätzlich die Diastereomerenreinheit des Produktes zu analysieren, wurde mittels chiraler GC-Säule ein GC-MS angefertigt. Das zum Vergleich nötige Diastereomergemisch aus (2*S*/*R*,3*R*)-3-Hydrox-2-methylpentanal wurde unabhängig durch Keto-Enol-Tautomerie aus dem mit FSA D6A/T26L hergestellten Aldehyd gewonnen (Abb. 80.). Dafür wurde dieser in verdünnter Natronlauge bei einem pH-Wert von 9,3 für 18 Stunden inkubiert. Durch freie Konfigurationseinstellung an Position 2 entstand ein Diastereomergemisch im Verhältnis 2:1.



**Abb. 80.** Umwandlung von (2*S*,3*R*)-3-Hydrox-2-methylpentanal zu (3*R*)-3-Hydrox-2-methylpentanal durch Keto-Enol-Tautomerie

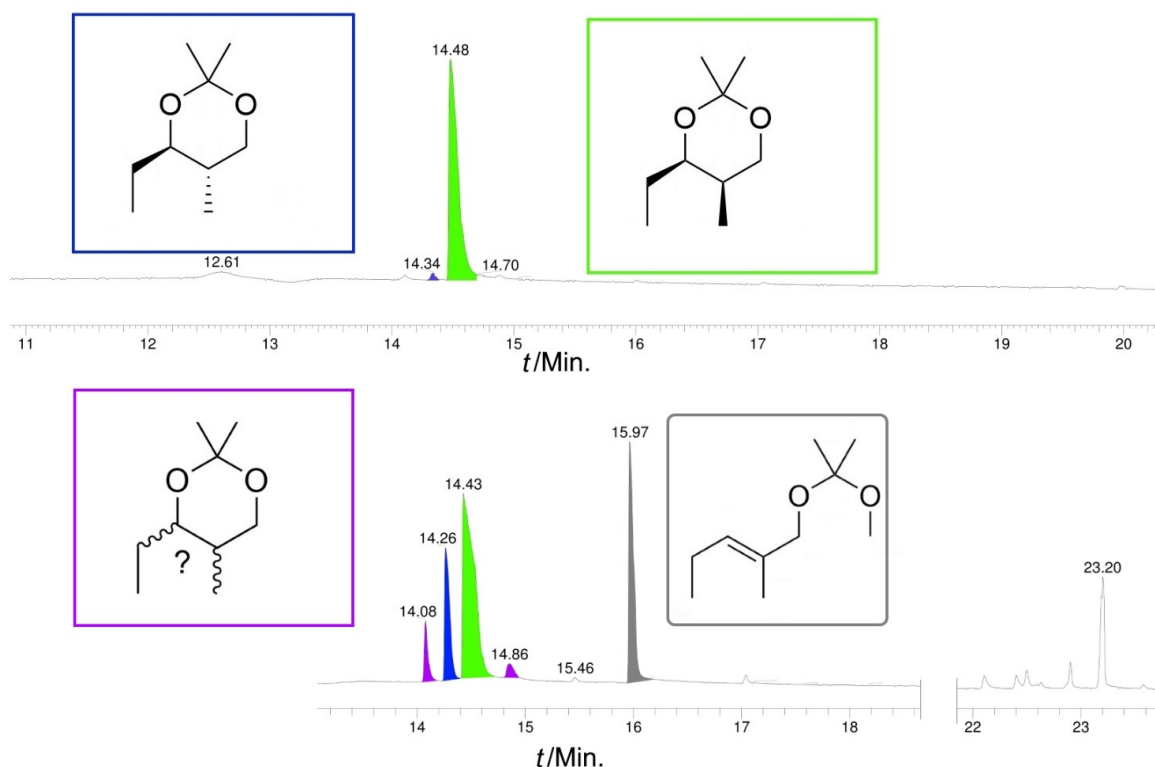
Da die anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid<sup>[129]</sup> in Wasser erfolgte, und dabei im Basischen langsam hydrolysiert<sup>[134]</sup>, wurde die doppelte stöchiometrische Reagenzmenge verwendet. Das NMR-Spektrum zeigte im Gegensatz zum direkt reduzierten Aldehyd beide Diastereomere im Verhältnis 2:1. Da damit die NMR-Signale beider Diastereomeren bekannt waren, konnte das Diastereomerenverhältnis der enzymatisch gebildeten Verbindung mittels NMR-Integration als 94,17 % bestimmt werden. Dazu wurde das Signal bei 1.8 ppm verwendet. Das Diol wurde zudem wie oben beschrieben geschützt und die NMR-Daten des Acetonids mit den Literaturdaten von (4*R*,5*S*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan (Abb. 81.)<sup>[133]</sup> sowie den Daten des zuvor hergestellten diastereomerenreinen (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan verglichen.



**Abb. 81.** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von (4*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan mit (4*R*,5*S*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan und (4*R*,5*S*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan aus der Literatur<sup>[133]</sup>

Laut NMR betrug die Diastereomerenreinheit des Acetals 92,3 % (durch Integration des ddd bei 3.36 ppm bestimmt). Anschließend wurde das geschützte Diol zusätzlich per GC-MS untersucht (Abb. 82.). Während dieses lediglich ein einziges Signal lieferte, spaltet das durch Tautomerie hergestellte, geschützte (3*R*)-3-Hydrox-2-methylpentanal in 4 Peaks mit den gleichen Massewerten auf.





**Abb. 82.** GC-MS Vergleich von - mit FSA D6A/T26L hergestelltem - (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan und durch Keto-Enol-Tautomerie veränderten 4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan sowie der Verunreinigung (E)-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-methyl-pent-2-en

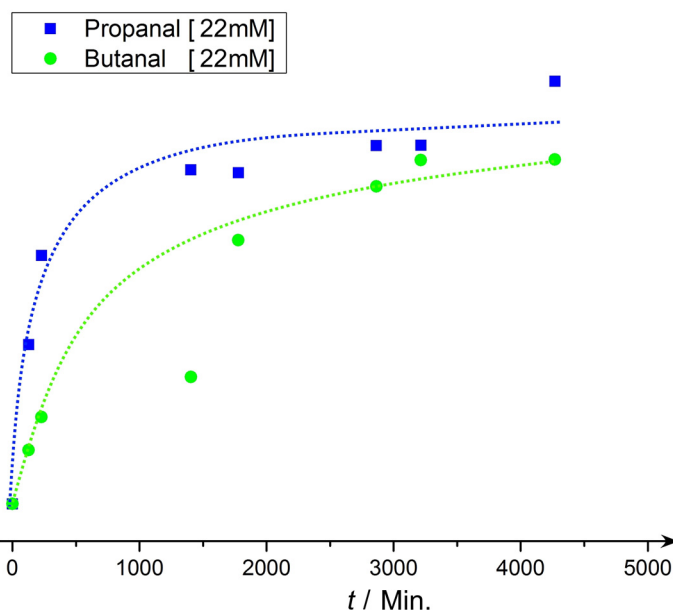
Möglicherweise war es während der Keto-Enol-Tautomerie an Position 3 ebenfalls zu einer Tautomerie an Position 2 gekommen. Zusätzlich fiel ein Signal bei 15,97 min auf. Es handelte sich dabei um (E)-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-methyl-pent-2-en, welches durch Eliminierung von 3-Hydrox-2-methylpentanal unter den basischen Bedingungen der Keto-Enol-Tautomerie und anschließender Schützung mit Aceton entstanden war. Da bei der Herstellung dieses Dioxans auf Zwischenaufreinigungen und NMR-Analyse zwecks Ausbeuteoptimierung verzichtete wurde, das NMR-Signal des Nebenproduktes jedoch größtenteils von dem des Enzymproduktes überlagert wurde, konnte die Verunreinigung erst durch das GC-MS-Experiment erkannt werden. Die NMR-Analyse des tautomerisierten (3*R*)-3-Hydrox-2-methylpentanal wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung durchgeführt, das Dioxan stammte jedoch aus einem anderen Reaktionsansatz. Ein Kontrollexperiment, bei dem 2-Methyl-2-pentenal mit der gleichen Methodik reduziert und mit Aceton geschützt wurde, zeigte dasselbe MS-Zerfallsmuster. Das Signal bei 23,20 min konnte nicht zweifelsfrei erklärt werden, aufgrund seiner  $R_f$ -Distanz zu den anderen Signalen hat es jedoch wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Auswertung. Laut GC-MS beträgt die Diastereomerenreinheit 94,0 %.

Da beim Screening mit Butanal möglicherweise zu viel Aldehyd eingesetzt worden war, weswegen es zu einer Denaturierung und Inaktivierung von FSA gekommen war, wurde probenhalber trotzdem eine präparative Reaktion mit FSA D6A/T26L und Butanal durchgeführt. Überraschenderweise konnte eine Produktbildung per dünnschichtchromatographischer Analyse festgestellt werden. Es erfolgte eine Aufreinigung, Reduktion, Schützung, NMR-Charakterisierung und GC-MS-Untersuchung, ganz analog zur Reaktion mit Propanal. Auf gleiche Weise wurde auch hierfür das Diastereomeregemisch hergestellt. Lediglich die Extraktion des Dioxans erfolgte aufgrund des stärker unpolaren Charakters mit Cyclohexan. Auch wurde das durch Keto-Enol-Tautomerie hergestellte Gemisch des 3-Hydrox-2-ethylhexanals nicht charakterisiert.



Der Diastereomerenanteil laut Dioxan NMR betrug 96,0 %. Im GC-MS war kein Peak eines anderen Diastereomers zu sehen, so dass formal von 100 % *de* auszugehen ist. Aufgrund der schlechteren Peaktrennung ist der Diastereomerenpeak aber möglicherweise nicht sichtbar, so dass 96 % ein realistischer Wert ist.

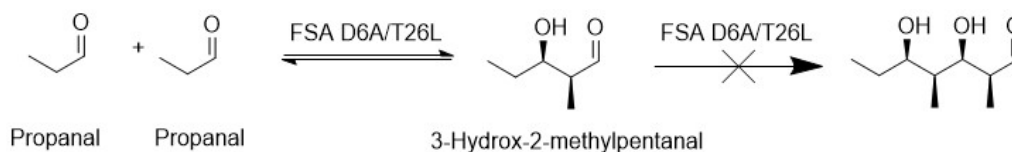
Um die relative Substratazeptanz von FSA D6A/T26L für Propanal und Butanal zu evaluieren, wurde lyophilisiertes Protein in TEA-Puffer mit den jeweils frisch destillierten Aldehyden und DTT resuspendiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mit Methanol gemischt. Ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation entfernt, dann wurde ein Teil der Probe per GC analysiert (Abb. 83.).



**Abb. 83.** Kinetik der durch FSA D6A/T26L katalysierten Produktbildung von 3-Hydrox-2-methylpentanal (blau) und 3-Hydrox-2-ethylhexanal

Der Geschwindigkeitsunterschied für die Umsetzung der beiden Elektrophilen beträgt ungefähr 2,8 zugunsten des kleineren und reaktiveren Propanals. Die Aldehydkonzentration von 22 mM wurde gewählt, um ein Denaturieren der FSA durch Butanal zu verhindern.

Da manche Aldolasen, wie z. B. die DERA in der Lage sind, ein aldehydisches Produkt in einer Kaskadenreaktion als Substrat wiederzuverwenden<sup>[65,135]</sup> und so noch größere Moleküle aufzubauen, wurde der präparative Versuch mit FSA D6A/T26L und Propanal wiederholt (Abb. 84.). Die Reaktionszeit betrug 5 Tage. Es konnte jedoch kein Hinweis auf eine Doppelaldolreaktion gefunden werden. Als Kontrolle diente mittels DERA bereitgestellte 2,4-Dimethyl-2,4,6,7-tetradeoxy-D-*allo*-heptose<sup>[118,136]</sup>.



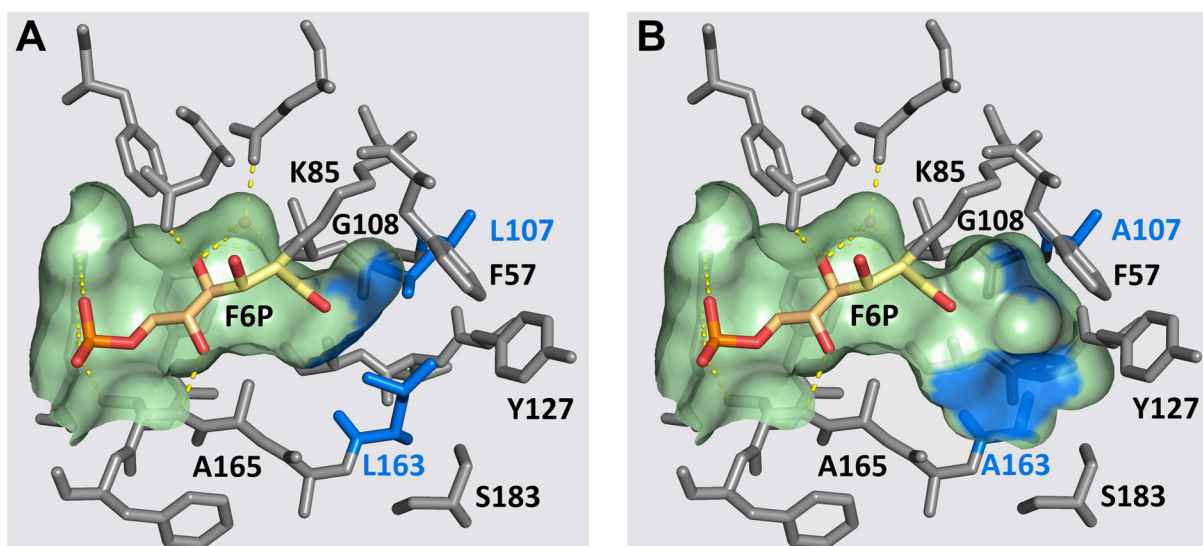
**Abb. 84.** Reaktionsschema einer Doppelaldoladdition von Propanal durch FSA D6A/T26L (wurde nicht gefundenen)

Obwohl das Screening nach 3-Pentanon akzeptierenden Varianten negativ verlaufen war, wurde probenhalber doch eine präparative Probereaktion mit 3-Pentanon und Propanal angesetzt. Um das Löslichkeitsproblem von 3-Pentanon zu beheben, wurde die Reaktion in Diethylether angesetzt. Zur Gewährleistung der FSA-Aktivität in organischen Lösungsmitteln wurden ganze lyophilisierte Zellen verwendet. Weder mit FSA D6A/L163A noch mit der eigens für diesen Zweck hergestellten FSA-Variante D6H/A165G konnte jedoch nach 5-tägiger Reaktionszeit eine Produktbildung eindeutig nachgewiesen werden. Offenbar war mit dem hohen sterischen Anspruch bei gleichzeitiger geringer Reaktivität des Ketons zur Bildung der Schiff-Base die Grenze des Machbaren überschritten.

---

### 3.7. Vergrößerung des aktiven Zentrums der FSA

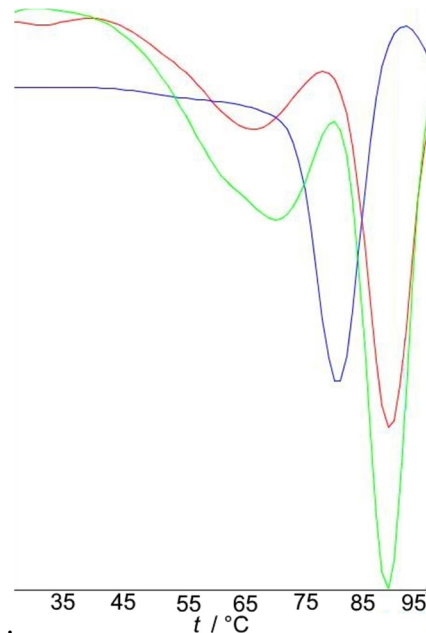
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Mitwirkung in einem Projekt zur Vergrößerung des aktiven Zentrums der FSA, um die Akzeptanz von größeren Hydroxydonorsubstraten zu erreichen. Durch gemeinsame Vorarbeit mit unserem Kooperationspartner Clapés *et al.*<sup>[137]</sup> konnte mittels dünnschichtchromatographischer Analyse gezeigt werden, dass die FSA-Variante L163A mit 3-Hydroxypentanal und 1-Hydroxypentan-2-on<sup>[138][139]</sup> als nukleophiles Substratanaloga jeweils ein neues Produkt herstellt. Aus diesem Grund wurde diese Reaktion in präparativem Maßstab wiederholt. Das Enzym wurde durch die Zugabe von Methanol bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation abgetrennt. Nach Evaporation des Lösemittels wurde der zurückbleibende viskose Feststoff in Aceton suspendiert und das abdekantierte Lösungsmittel wurde erneut evaporiert. Das erhaltene Öl wurde per Säulenchromatographie über normales Kieselgel und anschließend per C18-Säule aufgereinigt. Das Produkt konnte mittels NMR-Analyse als (5*S*,6*R*)-5,6,8-Trihydroxyoctan-4-on identifiziert werden. Damit war bewiesen, dass die FSA L163A größere Donorsubstrate als der Wildtyp akzeptiert, was durch die Vergrößerung des aktiven Zentrums möglich geworden war. Um diesen Effekt weiter zu verstärken und das Substratspektrum zusätzlich zu erweitern, bot es sich an, den Austausch L163A zusätzlich mit der Mutation L107A zu kombinieren, um eine homogen vergrößerte hydrophobe Tasche im aktiven Zentrum zu kreieren (Abb. 85.).



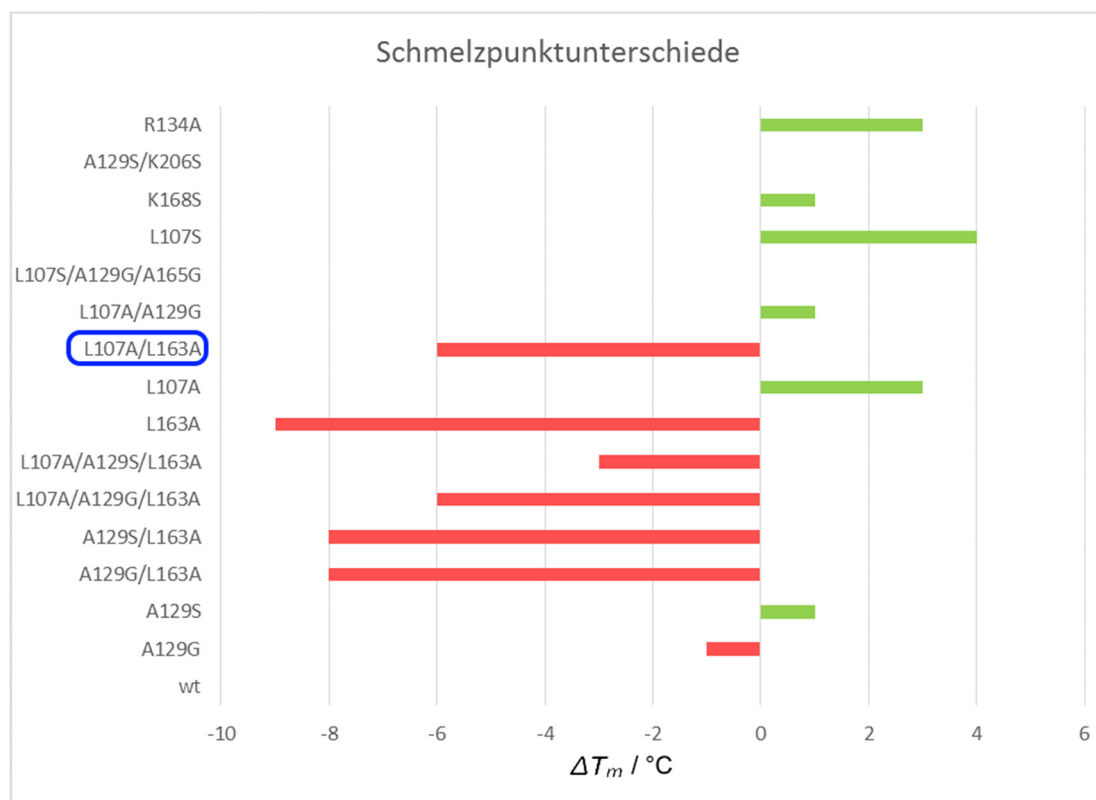
**Abb. 85.** Darstellung von an K85 gebundenem F6P im aktiven Zentrum von FSA wt (A) und zum Vergleich, die mit einem größeren Volumen im aktiven Zentrum ausgestatteten FSA-Variante L107A/L163A<sup>[75]</sup>

Die FSA ist zwar aufgrund ihres Vorliegens als Decamer und der daraus folgenden hohen Thermostabilität für solche Mutationsexperimente gut geeignet - so ist sie noch bei 75 °C katalytisch aktiv - eine solch signifikante Veränderung von Enzymen ist jedoch prinzipiell kritisch, da das Schaffen eines so großen zusätzlichen Hohlraums im aktiven Zentrum auch zu dessen Instabilität führen könnte. Zwar befinden sich die zu mutierenden Aminosäurepositionen im aktiven Zentrum der FSA - welches aus einem  $\beta$ -Barrel besteht - und nicht in den  $\alpha$ -Helices, welche maßgeblich für die Stabilität solcher Enzyme verantwortlich sind<sup>[87]</sup>, einige Vorabversuche zur Abklärung der Auswirkung von Mutationen auf die Thermostabilität schienen jedoch sinnvoll. Um den Effekt der Mutationen besser beurteilen zu können, wurden zunächst verschiedene FSA-Varianten aus der Gruppe von Clapés *et al.* mit dem *Thermal Shift Assay* auf Stabilitätseinbußen hin untersucht<sup>[140,141]</sup>.

Bei diesem werden die zu Proteine mit einem umgebungsempfindlichen Fluoreszenz-Farbstoff (*SYPRO Orange*) gemischt. Anschließend wird die Probe schrittweise erwärmt. Denaturiert nun das Protein, bindet der Farbstoff an die dabei freigelegten hydrophoben Strukturen des Enzyminneren und verändert daraufhin seine Emissionseigenschaften. Berechnet man die Ableitung des Fluoreszenzverlaufes kann man daraus leicht den Denaturierungs- und somit den Schmelzpunkt ablesen (Abb. 86.)<sup>[141]</sup>.

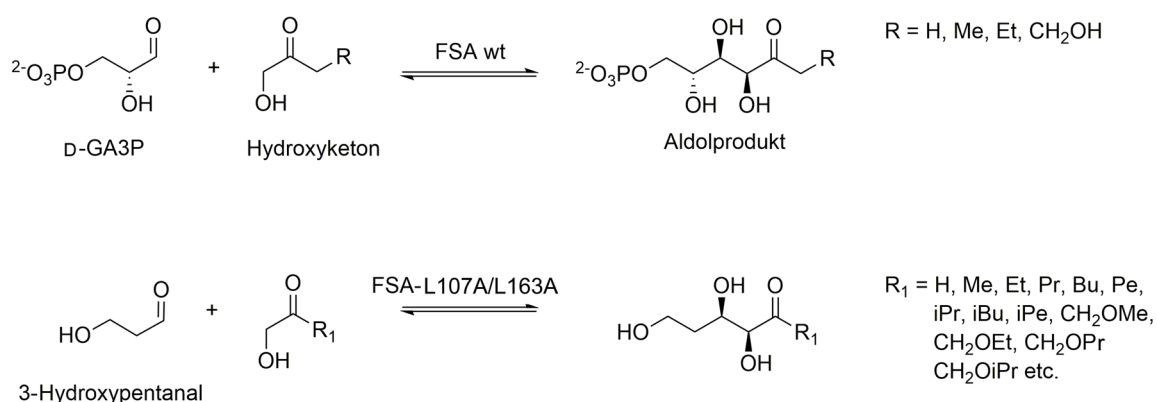


**Abb. 86.** Schmelzkurven-Diagramm (1. Ableitung) ausgewählter FSA-Varianten aus der Gruppe von Clapés *et al.* Grün ist FSA wt, blau ist FSA L163A, rot ist A129S.



**Abb. 87.** Schmelzpunkttemperaturen verschiedener FSA-Varianten aus der Zusammenarbeit mit der Gruppe von Clapés *et al.*. Positive (grüne) Werte bedeuten eine Zunahme, negative (rote) Werte eine Abnahme der Proteinstabilität<sup>[47]</sup>.

Bei der Betrachtung der verschiedenen Schmelzpunkte (Abb. 87.) fällt auf, dass die unterschiedlichen Denaturierungspunkte von Mehrfachmutanten weitgehend durch die Addition der Denaturierungspunkte ihrer Einzelmutationen vorausgesagt werden können. So ist die Denaturierungstemperatur von FSA L107A gegenüber FSA wt um 3 °C erhöht, die von FSA A129G um 1 °C erniedrigt. Der Denaturierungspunkt von FSA L107A/A129G ist 1 °C höher als der des Wildtypes, was in etwa der Addition beider Werte entspricht. Obwohl die Variante L163A einen um ca. 9 °C geringeren Schmelzpunkt als der Wildtyp aufwies war daher davon auszugehen, dass die Doppelvariante FSA L107A/L163A hinreichend stabil sein sollte. Der Unterschied ihres Denaturierungspunktes gegenüber von FSA wt betrug exakt -6 °C, was die Addition der Werte beider Einzelmutanten darstellt. Die mittels *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Abb. 85.) hergestellte FSA-Variante L107A/L163A zeigte darüber hinaus in den weiteren Versuchen im AK von Dr. Deniz eine bemerkenswerte Akzeptanz für größere Hydroxydonorsubstrate wie 1-Hydroxyheptanon oder sogar das verzweigte 1-Hydroxy-5-methyl-hexanon<sup>[47]</sup> (Abb. 88).



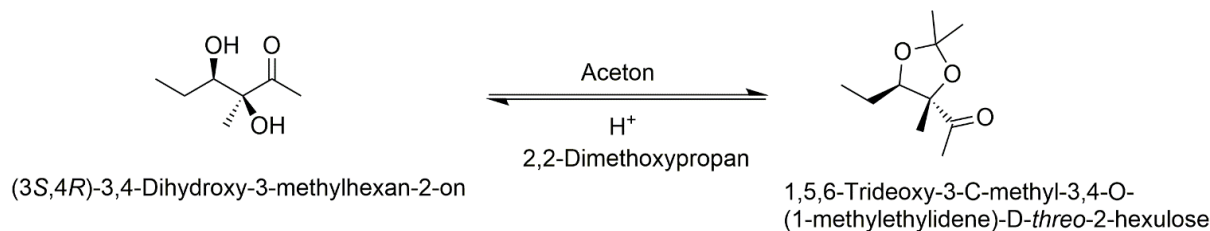
**Abb. 88.** Von Fessner und Clapés *et al*<sup>[137]</sup>, mittels der erzeugten FSA-Variante L107A/L163A durchgeführte Substratsynthesen<sup>[47]</sup>

Im weiteren Verlauf der Arbeit kam die Idee auf, das aktive Zentrum der FSA räumlich um die Hydroxybindestelle des Donorsubstrates zu erweitern. Dafür wurde die Variante A165G/T185A mit dem *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Abb. 61.) erstellt, welche die Reaktion von Acetoin mit Propanal zu (3*S*,4*R*)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on erfolgreich katalysierte (Abb. 89.). Um die Aufarbeitung der Reaktion zu erleichtern, wurde sie in MTBE mit ganzen lyophilisierten Zellen, welche die FSA-Variante enthielten, durchgeführt. Nach Abtrennen der Zellen durch Zentrifugation musste lediglich das Lösungsmittel evaporiert und die verbleibenden Edukte unter Vakuum entfernt werden.

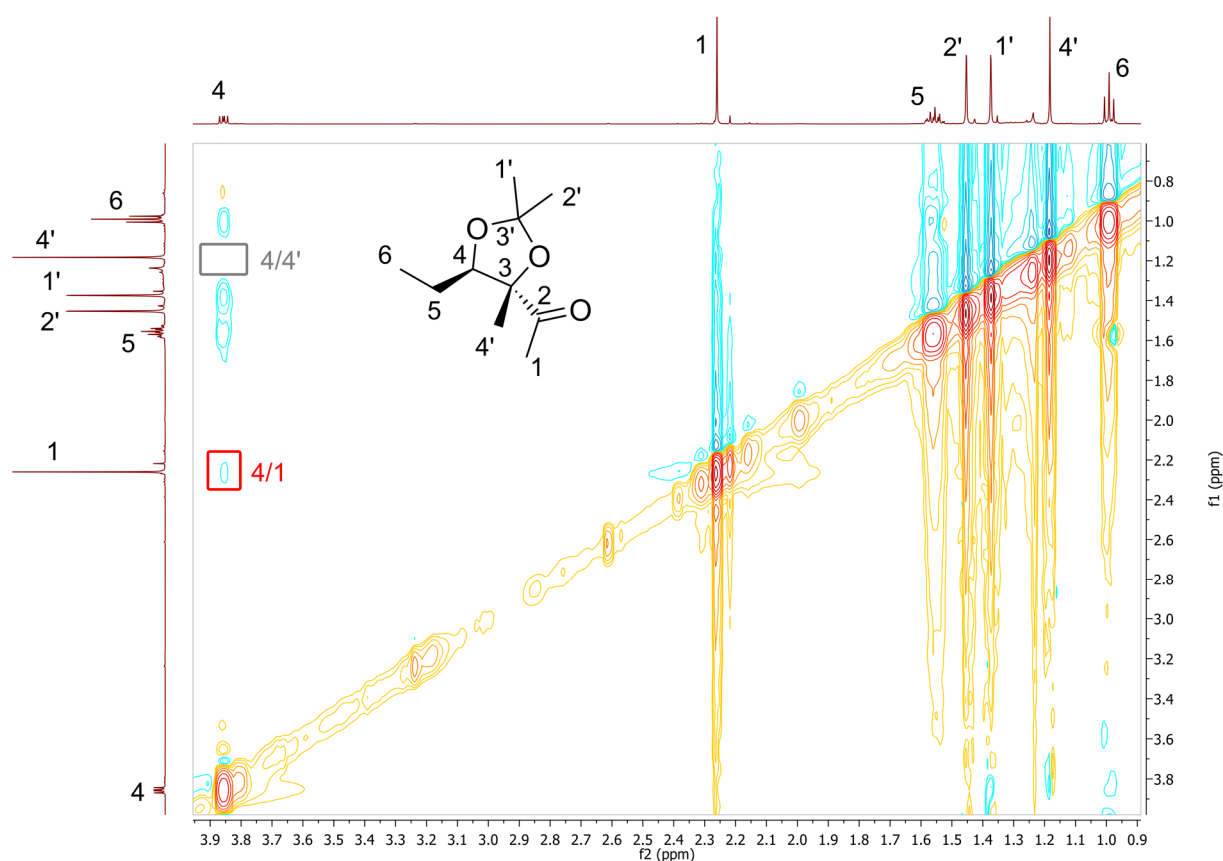


**Abb. 89.** Herstellung von (4*R*)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on mittels FSA A165G/T185A in MTBE aus Acetoin und Propanal

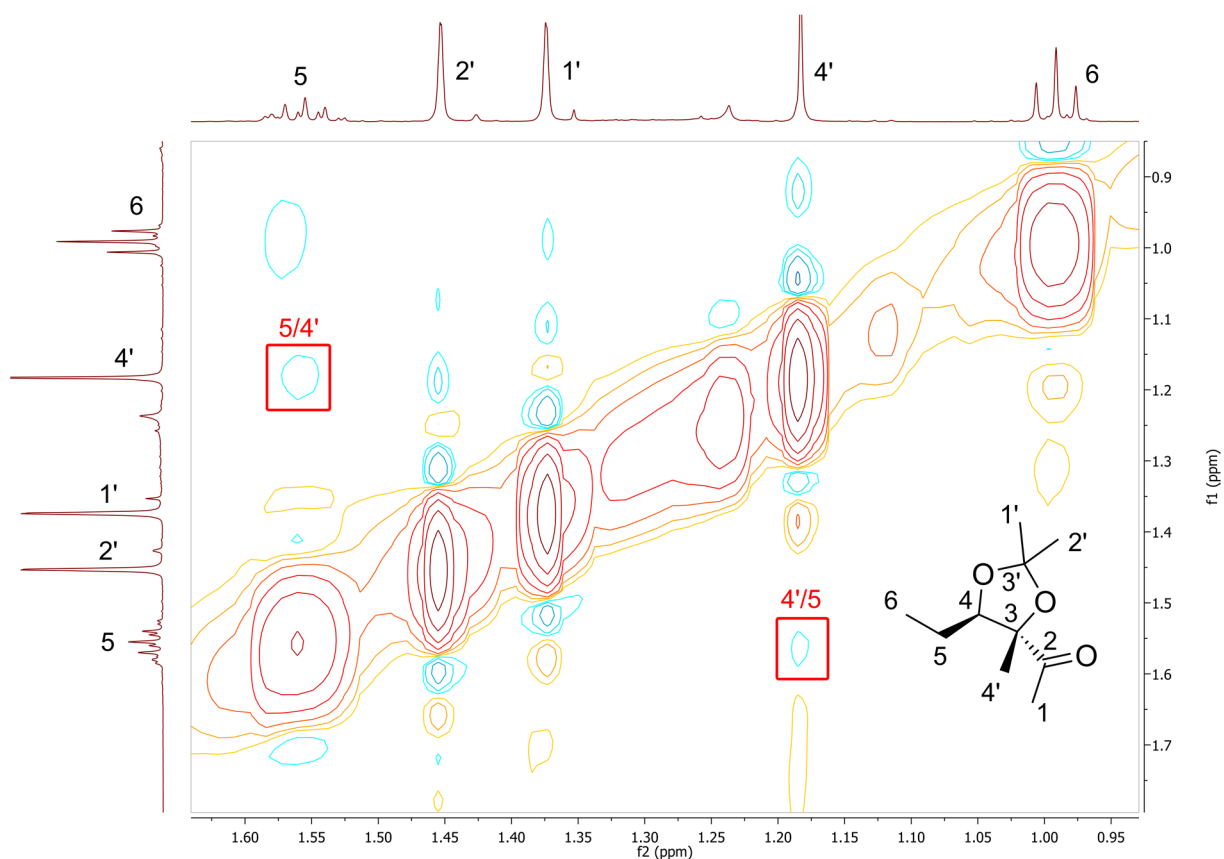
Um die relative Konfiguration zu bestimmen, wurde das Produkt nach Umwandlung mit Aceton zum Dioxolan (Abb. 90.) NMR-spektroskopisch analysiert. Aufgrund der Abwesenheit von Protonen am quartären Kohlenstoffatom konnte keine Information über die Kopplungskonstanten gewonnen werden weshalb ein NOESY-Spektrum aufgenommen wurde (Abb. 92., Abb. 91.).



**Abb. 90.** Mit Aceton und *para*-Toluolsulfonsäure geschütztes (3*S*,4*R*)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on zur NMR-spektroskopischen Untersuchung der Konfiguration.



**Abb. 91.** NOESY-Spektrum von 1,5,6-Trideoxy-3-C-methyl-3,4-O-(1-methylethyliden)-D-*threo*-2-hexulose zur Aufklärung der relativen Konfiguration



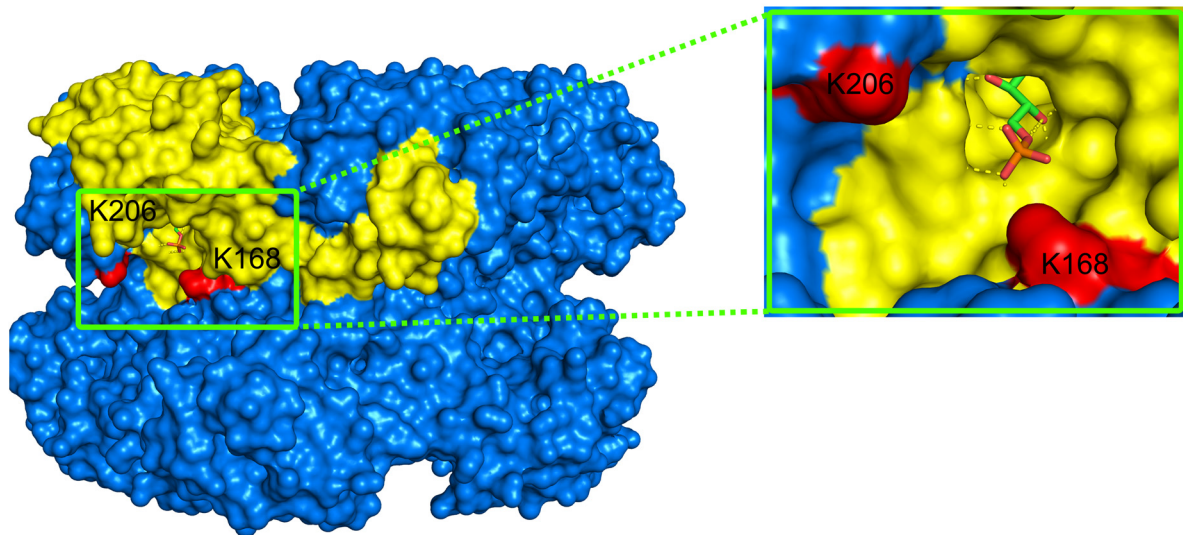
**Abb. 92.** NOESY-Spektrum von 1,5,6-Trideoxy-3-C-methyl-3,4-*O*-(1-methylethyliden)-D-*threo*-2-hexulose zur Aufklärung der relativen Konfiguration.

Das Kreuzsignal von 5 und 4' zeigt, dass beide Protonen wahrscheinlich auf der gleichen Seite des Moleküls liegen. Dies wird durch das Kreuzsignal von 4 und 1 sowie der Abwesenheit eines Kreuzsignales zwischen 4 und 4' bestätigt. Dadurch ist, unter der plausiblen Prämisse, dass durch die Mutation die Chiralität der 4-Hydroxygruppe nicht verändert wurde, somit auch die absolute Konfiguration bekannt (1,5,6-Trideoxy-3-C-methyl-3,4-*O*-(1-methylethyliden)-D-*threo*-2-hexulose).



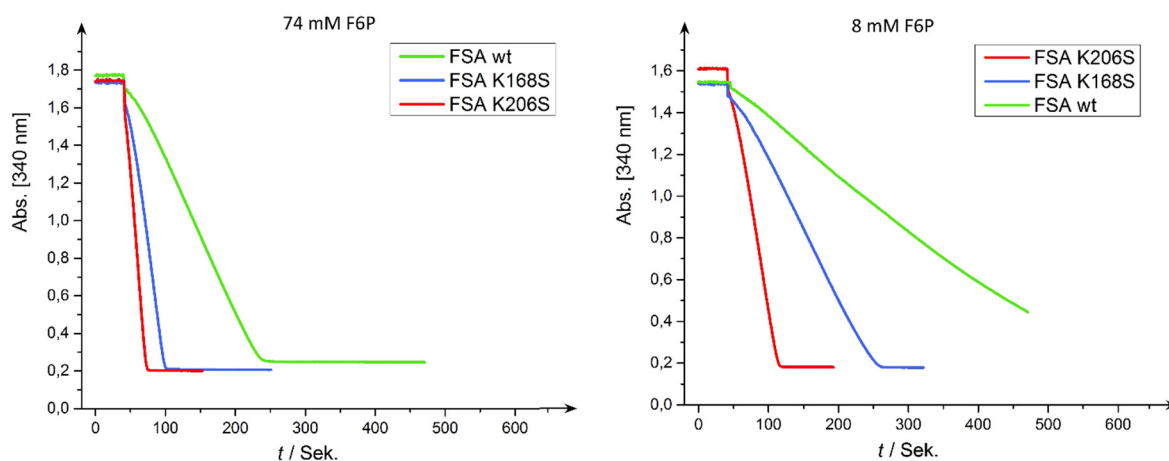
### 3.8. Erhöhung der Katalysegeschwindigkeit von FSA wt

Während der Arbeit an der FSA und ihren Mutanten zur Erweiterung des Substratspektrums kam die Idee auf, dass die verschiedenen Substrate nicht nur an K85 im aktiven Zentrum, sondern auch reversibel über eine Schiff'sche Base an die verschiedenen Lysine an der Außenseite der FSA binden könnten. Da der Zugang zum aktiven Zentrum durch die Decamerstruktur in einer Proteinfalte liegt, könnte es dadurch zu einer partiellen Blockierung des Zentrums kommen, was eine Verringerung der katalytischen Aktivität nach sich ziehen würde.



**Abb. 93.** Kristallstruktur der FSA mit D-F6P als Substrat. Die betrachtete Untereinheit ist gelb eingefärbt, die möglicherweise mit D-F6P eine Schiff'sche-Base bildenden Lysine sind rot gefärbt<sup>[75]</sup>.

Um dies zu Überprüfen wurden die Lysine K206 und K168 jeweils mithilfe der *QuickChange Lightning*-Methode mutiert. Dabei wurden sie gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht, da diese klein und polar ist und nicht in der Lage eine Schiff-Base auszubilden. Anschließend wurde die Aktivität dieser FSA-Varianten mithilfe des D-Fructose-6-phosphat-Assays untersucht. Da aufgrund der schwachen Bindung von D-F6P an die äußeren Lysine die Stärke des inhibitorischen Effektes wahrscheinlich von der Konzentration abhängig ist, wurde das Experiment mit einer niedrigen und einer hohen Substratkonzentration durchgeführt (Abb. 94.).



**Abb. 94.** Vergleich der Kinetik verschiedener FSA-Varianten bei verschiedenen D-F6P-Konzentrationen

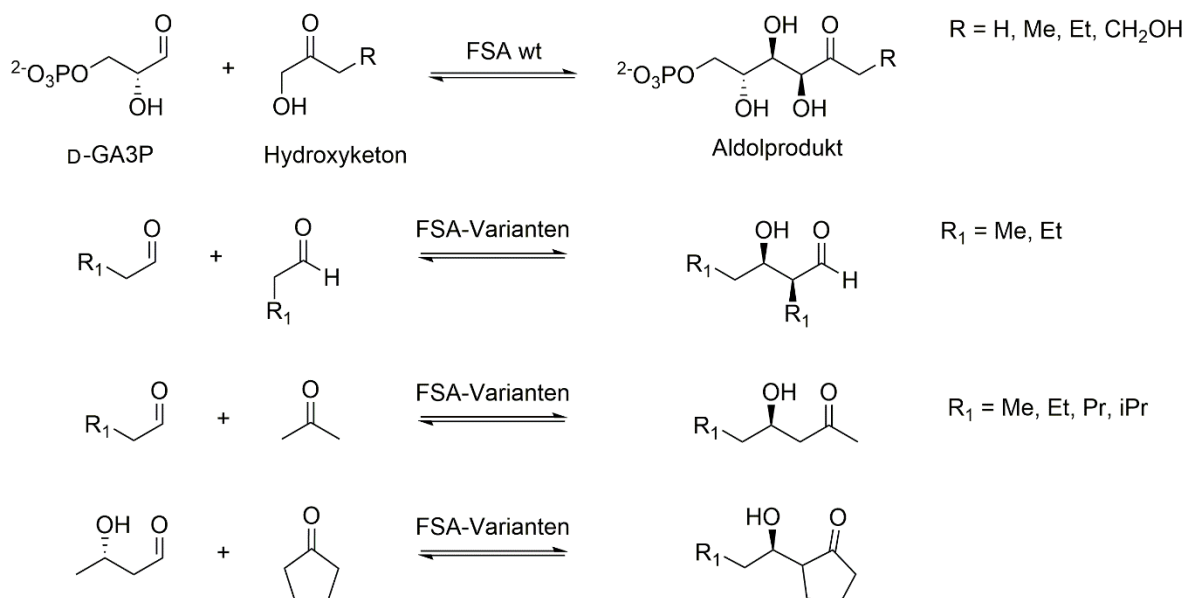


Dabei konnte durch die Mutation K168S je nach D-F6P-Konzentration eine drei- bis fünffach schnellere Spaltung des Substrates beobachtet werden. Die FSA-Variante K206S erreichte sogar beinahe eine siebenfache Spaltungsgeschwindigkeit. Die vorausgesagte Verstärkung des geschwindigkeitserhöhenden Effektes bei hohen Substratkonzentrationen bestärkt die Hypothese, dass die aus den Lysinresten und dem Substrat gebildeten Schiff'schen Basen den Weg zum aktiven Zentrum blockieren.

---

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

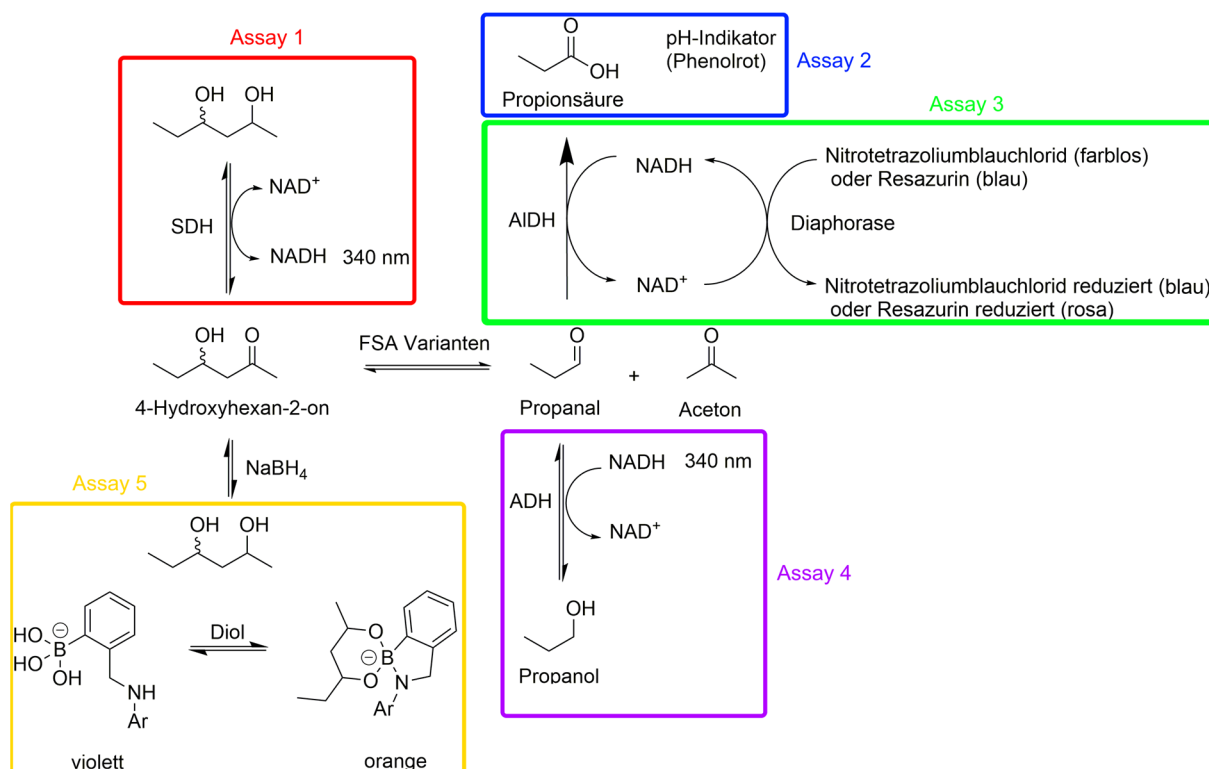
Primäres Ziel dieser Arbeit war, es das Donorspektrum der Fructose-6-phosphat-Aldolase um nicht hydroxylierte Ketone und Aldehyde zu erweitern, um so wichtige Struktur motive aus Natur und Industrie über enzymatische Synthese zugänglich zu machen, wie in Abb. 95. dargestellt.



**Abb. 95.** Native Reaktionen, die durch wt FSA katalysiert werden, sowie neue Reaktivitäten, die durch mittels Protein-Engineering erhaltene Varianten katalysiert werden können

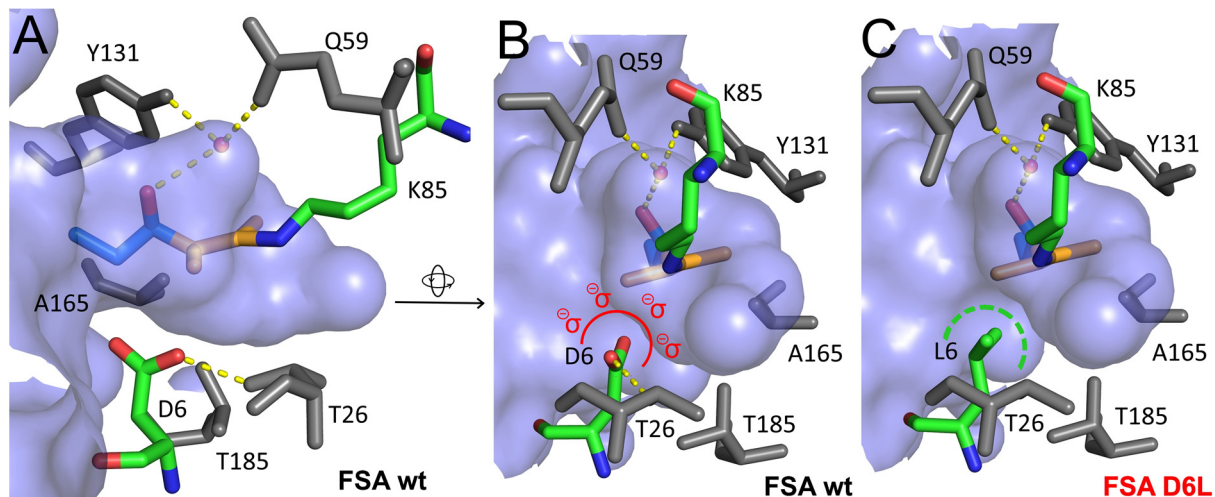
Dafür wurde mittels *CAST*-Strategie und *Superfamily-Analyse* durch das Programm *3DM Bioprodict* die *smarte* FSA-Mutanten-Bibliothek D6X/T26X mit 48 möglichen Mutanten erzeugt. Des Weiteren wurden die FSA-Mutantenbibliotheken D6H/N28X, D6L/N28X und D6E/N28X erstellt.

Zum *Screening* dieser Bibliotheken wurden verschiedene enzymatisch/chemische Assaysysteme getestet und evaluiert (Abb. 96.). Wegen der chemischen Ähnlichkeit von Aldolsubstraten und den daraus resultierenden Aldolprodukten, der Inkompatibilität der getesteten Assayfarbstoffe mit dem für die FSA-Aktivität essenziellen DTT oder der Adsorption des Farbstoffes an Zellteilen musste ein neuer dünnschichtchromatographischer Assay entwickelt werden. Dieser ist in der Lage, verschiedene Produkte gleichzeitig zu detektieren und erlaubt in Kombination mit *HPTLC* auch eine quantitative Untersuchung bezüglich der Enzymgeschwindigkeit und Enzymselektivität. Der ebenfalls erfolgreich getestete pH-Assay wurde aus Gründen der Komplexität und seiner Abhängigkeit von der Synthese individueller Assaysubstrate verworfen.



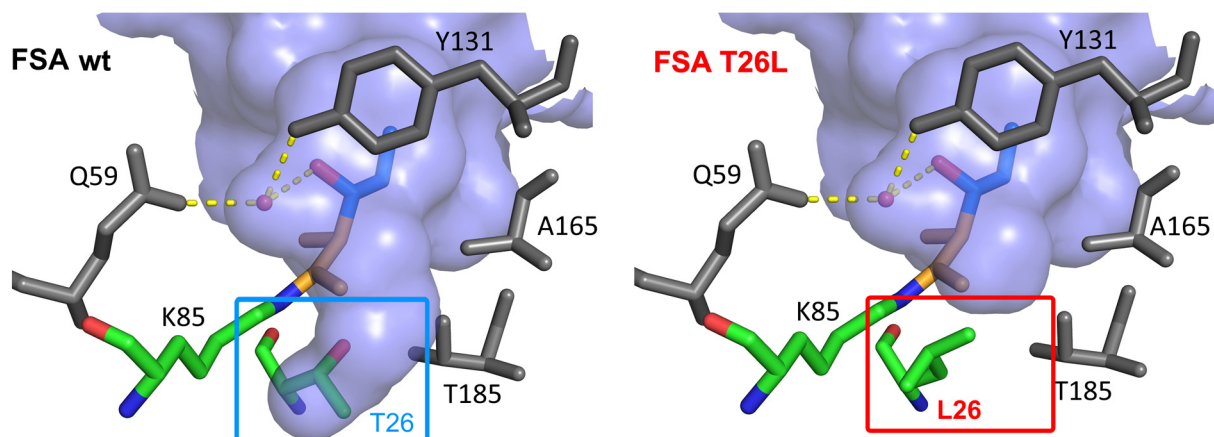
**Abb. 96.** Übersicht an getesteten Assays zur Detektion von Aceton akzeptierenden Aldolasen

Das *Screening* der D6E/N28X-, D6H/N28X- und D6L/N28X-Bibliotheken bewies, dass an der Position 28 ein Asparagin für die katalytische Aktivität der FSA unbedingt notwendig ist, da alle Mutationen an dieser Position zur Inaktivierung des Enzyms führten. Durch das *Screening* der D6X/T26X-Bibliothek konnten - neben der literaturbekannten FSA-Variante D6H<sup>[77]</sup> und den im Rahmen der Kooperation mit der Gruppe von Clapés entdeckten FSA-Varianten D6E und D6L - 24 neue FSA-Varianten identifiziert werden, die in der Lage sind, Aceton, Propanal, Butanal (Abb. 99) oder Cyclopentanone als Donorsubstrat umzusetzen. Dabei scheint ein Austausch von D6 zu unpolaren Aminosäuren wie Leucin, Histidin oder Alanin in der Lage, die Spezifität der Donorbindung von Hydroxyketonen zu nicht hydroxylierten Substraten zu verändern (Abb. 97.). D6E scheint dies aus bisher nicht näher bekannten Gründen ebenfalls zu können.



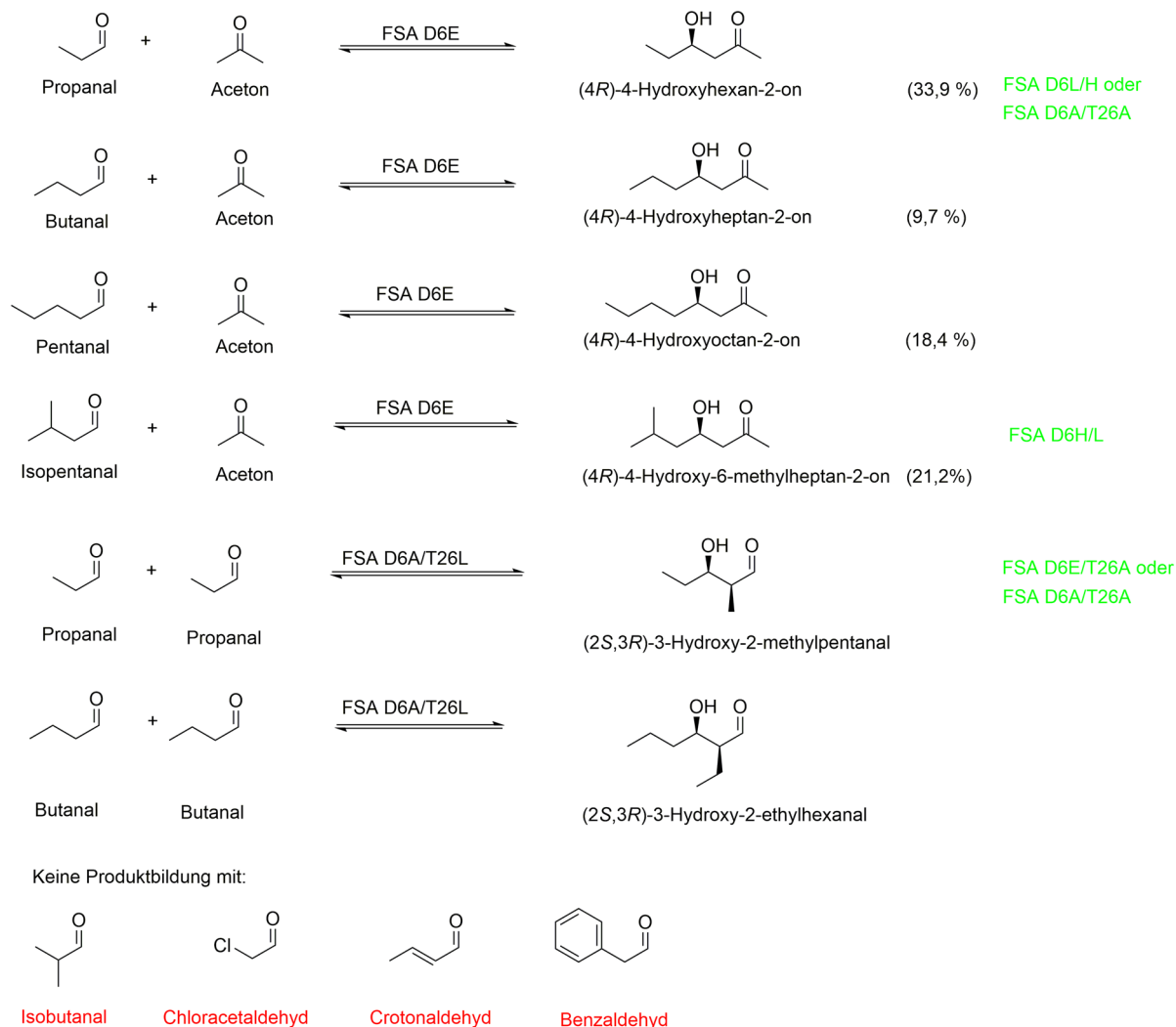
**Abb. 97.** Aktives Zentrum der FSA mit gebundenem 4-Hydroxy-3-methylhexan-2-on in zwei verschiedenen Orientierungen (A, B/C). Das Aceton/Propanal repräsentierende Substratmodell Butanon ist orange dargestellt, der Akzeptorsubstratteil blau. Während D6 durch seine **partielle Negativladung** die gute Bindung eines hydrophoben Substrates verhindert, sorgt die Mutation D6L (C) für eine **hydrophobe Umgebung**, wodurch die Bindung von Aceton oder Propanal begünstigt wird. Bei der virtuellen Mutantenerzeugung wurde das Rotamer der Aminosäure gewählt, welche die Vorzugskonformation darstellt. Die Oberfläche der FSA ist bläulich eingefärbt, die Perspektive ist aus dem Inneren des Proteins<sup>[75]</sup>.

Die Mutation D6V hingegen scheint nur in Kombination mit T26A oder T26L vorzukommen, möglicherweise wird hier für die Aceton-Bindung eine zusätzliche unpolare Aminosäure benötigt. Die einzelnen Varianten wurden mithilfe von Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie bezüglich ihrer relativen Geschwindigkeiten analysiert. Für die Reaktion von Aceton mit Propanal zu (4R)-4-Hydroxyhexan-2-on wurden FSA D6L, FSA D6H sowie FSA D6A/T26A als schnellste Varianten identifiziert. Für die Reaktion von Aceton mit Isovaleraldehyd zu (4R)-4-Hydroxy-6-methylheptan-2-on wurden FSA D6H und FSA D6L gefunden. Abgesehen von D6A und D6V haben alle positiven FSA-Varianten durch eine Mutation an Position 26 an katalytischer Aktivität eingebüßt. Dies ist vermutlich auf eine schlechtere Bindung von Aceton zurückzuführen. So ergab die Untersuchung der Selektivität gegenüber Aceton/Propanal, dass größere unpolare Reste an Position T26 wie Leucin oder Isoleucin die Selektivität der FSA zu Aldehyden hin beeinflusst. Wahrscheinlich kommt es zu einer sterischen Hinderung mit der distanten Methylgruppe von Aceton (Abb. 98.).



**Abb. 98.** Aktives Zentrum der FSA sowie FSA T26L mit 4-Hydroxy-3-methylhexan-2-on<sup>[75]</sup>

Dadurch war es möglich, die Selektivität der Variante D6H für Aceton durch die Kombination mit T26L in eine Selektivität für Propanal umzuwandeln. Die Bildung des Homoaldolproduktes (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanal fand am schnellsten mit D6E/T26A, D6A/T26A und D6A/T26V statt. Dabei wurde die Produktbildungsgeschwindigkeit von der zum Vergleich verwendeten DERA F200I um ca. 40 % übertroffen.

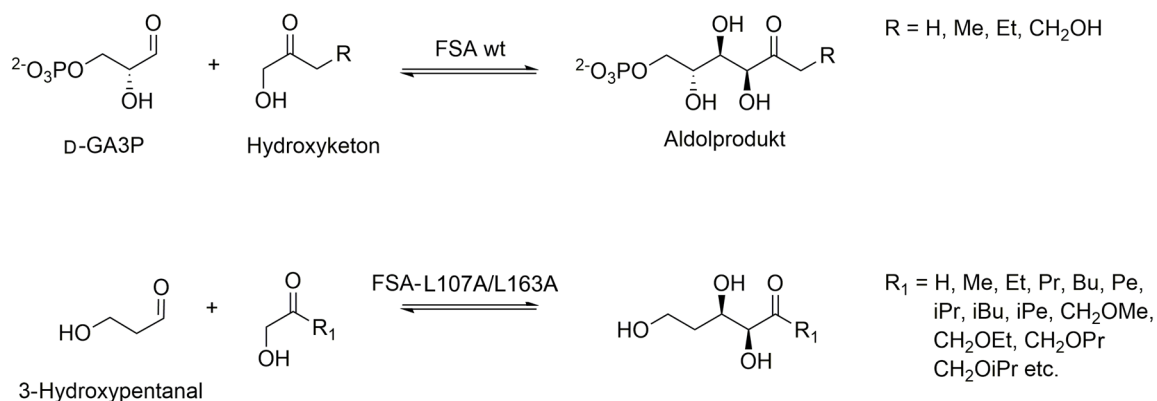


**Abb. 99.** Mittels FSA D6X-Varianten untersuchte, präparative Reaktionen sowie die daraus isolierten Produkte, **grün** = mittels HP-TLC für diese Substrate als schnellsten identifizierten FSA-Varianten **rot** = Reaktionsansätze ohne eindeutig nachweisbare Produktbildung

Die mit FSA D6A/T26L aus Propanal oder Butanal hergestellten Homoaldolprodukte (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanal und (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-ethylhexanal (Abb. 99.) konnten durch Reduktion des Aldehydes zum Diol identifiziert und charakterisiert werden. Nach Schützung mit Aceton zum Dioxan konnte die sehr hohe Diastereomerenreinheit von ca. 94 % *de* sowie die absolute Konfiguration nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte die Konfiguration des durch FSA D6E hergestelltem 4-Hydroxy-2-keto-Produkten bestätigt werden. Auch wurde die Fähigkeit von FSA D6E zur Katalyse von 4-Hydroxy-2-keto-Produkten bei der Suche nach einem geeigneten *Screening*-Substrat unter Beweis gestellt.

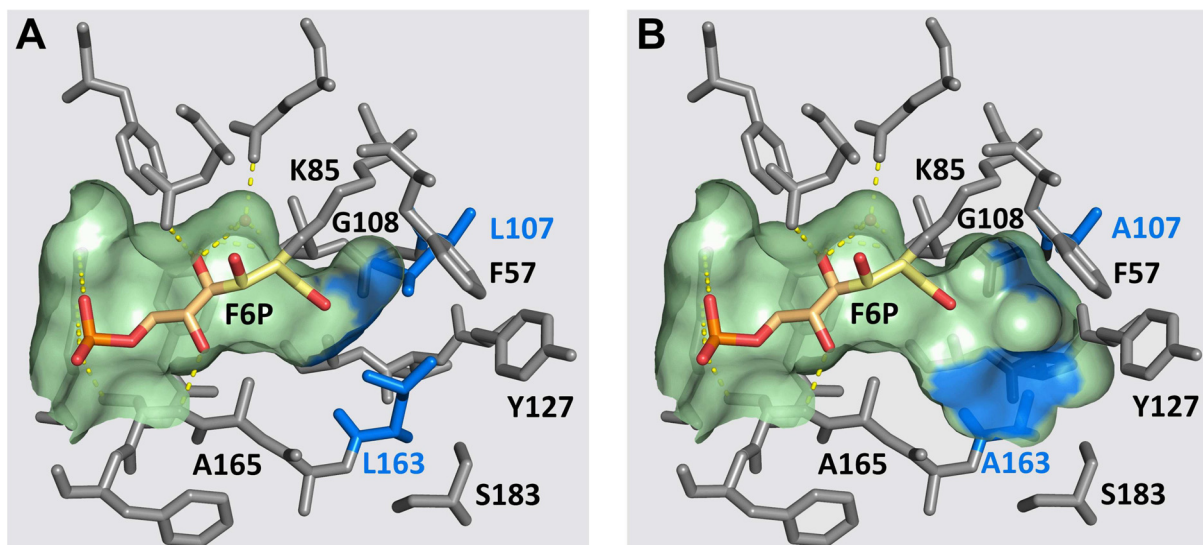
Eine versuchte Synthese des Pheromons Sitophilur (5-Hydroxy-4-methyl-heptan-3-on) des Reiskäfers (*Sitophilus oryzae* L.) aus 3-Pentanon und Propanal konnte wegen zu geringer Katalysatoraktivität leider nicht realisiert werden. Ein Screening der D6X/T26X Bibliothek mit Acetaldehyd, Cyclohexanon und Butanon zeigte ebenfalls keine neuen Produkte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Mitwirkung an einem Projekt zur Vergrößerung des aktiven Zentrums der FSA, um die Akzeptanz für größere Hydroxydonorsubstrate zu erreichen. Mithilfe der - von Clapés *et al.* hergestellten - FSA-Variante L163A konnte so aus 1-Hydroxypentan-2-on<sup>[138][139]</sup> und 3-Hydroxypentanal (5*S*,6*R*)-5,6,8-Trihydroxyoctan-4-on hergestellt werden. Somit konnte die - zuvor im Projekt nur mittels dünnschichtchromatographischer Analyse nachgewiesene – donorsubstrat-erweiternde Eigenschaft dieser Mutation verifiziert werden. Anschließend wurde die im Projekt bereits bekannten FSA-Varianten L107A mit L163A kombiniert. Die so hergestellte FSA-Doppelvariante zeigte in den weiteren Versuchen der Projektpartner eine bemerkenswerte Akzeptanz für größere Hydroxydonorsubstrate wie 1-Hydroxyheptanon oder 1-Hydroxy-5-methyl-hexanon (Abb. 100.).



**Abb. 100.** Von Fessner und Clapés *et al.*<sup>[142]</sup> mittels FSA L107A/L163A durchgeführte Substratsynthesen<sup>[47]</sup>

Dies ist wahrscheinlich auf die signifikante Vergrößerung des aktiven Zentrums zurückzuführen (Abb. 101.).



**Abb. 101.** Darstellung von an K85 gebundenem F6P im aktiven Zentrum von FSA wt (A) und im Vergleich, die mit einem größeren Volumen im aktiven Zentrum ausgestatteten FSA-Variante L107A/L163A<sup>[75]</sup>

Darüber hinaus konnte durch die Mutation A165G/T185A die Akzeptanz für Acetoin erreicht werden, wodurch das ungewöhnlich tertiär verzweigte Produkt (4*R*)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on hergestellt werden konnte (Abb. 102.).

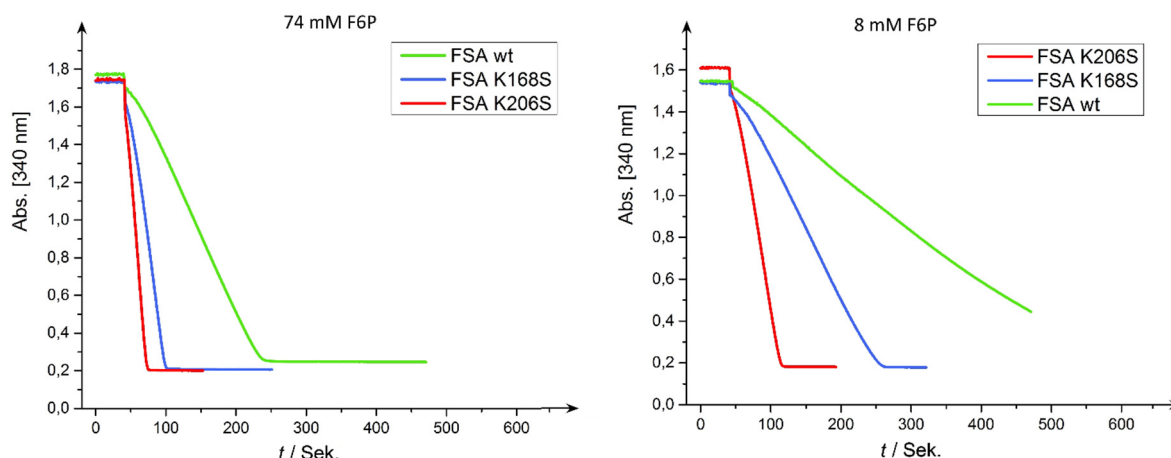




**Abb. 102.** Herstellung von (4R)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on mittels FSA A165G/T185A in MTBE aus Acetoin und Propanal

Damit ist erstmals auch die Möglichkeit der Herstellung von Verbindungen mit quartärem Kohlenstoff mit der FSA bewiesen. Die dabei verwendete Methode von ganzen lyophilisierten Zellen in reinem organischem Lösungsmittel zeigt darüber hinaus die breite Einsetzbarkeit von FSA. Das Produkt wurde zum Diol reduziert und nach Umwandlung mit Aceton zum Dioxolan konnte die relative Konfiguration nachgewiesen werden. Unter der Prämisse, dass durch die Mutation die Chiralität der 4-Hydroxygruppe nicht verändert wurde, ist somit auch die absolute Konfiguration bekannt.

In einem weiteren Experiment konnte durch die Mutation K168S je nach D-F6P-Konzentration mittels Fructose-6-phosphat-Assay eine drei- bis fünffache schnellere Spaltung des Substrates beobachtet werden (Abb. 103.). Die FSA-Variante K206S erreichte sogar beinahe eine siebenfache Spaltungsgeschwindigkeit.



**Abb. 103.** Vergleich der Kinetik verschiedener FSA-Varianten bei verschiedenen D-F6P-Konzentrationen

Da sich die Lysine K168 und K206 an der Außenseite der FSA in der Nähe des Eingangs zum aktiven Zentrum befinden, ist davon auszugehen, dass D-F6P-Moleküle reversibel über eine Schiff'sche Base auch an diesen binden könnte und somit den Weg ins aktive Zentrum blockieren würden. Durch die Mutationen kann dies nicht mehr stattfinden, wodurch es zu einer höheren Katalysegeschwindigkeit kommt. Die Verstärkung dieses Effektes bei höheren Substratkonzentrationen scheint diese Hypothese zu belegen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Arbeit das Verständnis über die Funktion der Aminosäuren im aktiven Zentrum der FSA stark erweitert und einige interessante neuartige Syntheseoptionen ermöglicht hat. Darüber hinaus wurde die Verwendbarkeit mehrerer *high throughput* –fähigen Aldolase-Assays ausführlich untersucht, so dass in zukünftigen Arbeiten bei Bedarf hierauf zurückgegriffen werden kann.

---

## 5. Experimenteller Teil

---

### 5.1. Geräte und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden - wenn nicht anders angegeben - bei *Sigma Aldrich* gekauft. Die Geräte und Medien zum Arbeiten mit Mikroorganismen und DNA wurden vorher autoklaviert. Alle Aldehyde wurden vor dem Verwenden destilliert. Für molekularbiologische Arbeiten wurden Standardvorschriften verwendet.

#### 5.1.1. Analytik

##### Geräte und Reagenzien

##### Hersteller

##### GC

GC-17A mit AOC-20s-Auto Sampler  
Trärgas: Stickstoff

*Shimadzu*

##### GC-MS

GC 8000 series  
Quadrupol-Massenspektrometer MD800  
Trärgas: Helium  
Chirale Säule (Rt- $\beta$ DEXsm)

*FISONS Instruments*

*Restek*

##### MS

Finnigan MAT 95

##### NMR 300 Mhz

300 MHz Avance III NMR Spektrometer

*Bruker BioSpin GmbH*

##### NMR 500 Mhz

500 MHz Avance III NMR Spektrometer

*Bruker BioSpin GmbH*

NMR-Lösungsmittel

*Sigma Aldrich*

---



### 5.1.2. Lösungen und Puffer

#### Anisaldehyd-Lösung

EtOH	200 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (konz.)	7,5 ml
Eisessig	2,2 ml

Die Lösung wurde gekühlt (- 20 °C) und mit Anisaldehyd (5,5 ml) versetzt.

#### Cersulfat-Lösung<sup>[123]</sup>

Cer(IV)sulfat	1 g
Konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 ml
VE-Wasser	85 ml

#### Coomassie PAGE-Färbelösung

<i>Coomassie</i> (G250 Brilliant Blue)	75 mg
VE-Wasser	1 l

Der pH-Wert wurde mit HCl (ca. 3 ml, 37 % HCl) auf 1,5 eingestellt.

#### DNA-Ladepuffer

TE-Puffer	10 ml
Bromphenolblau	25 mg
Saccharose	4 g

#### SDS PAGE-Probenpuffer (4x)

TRIS (1 M, pH 6,8)	2,0 ml
Glycerol	5,0 ml
EDTA (0,5 M)	1,0 ml
SDS	0,8 g
Bromphenolblaulösung (2 % in EtOH)	0,8 ml

**TBA-Puffer (0,5x)**

Folgende Chemikalien wurden in VE-Wasser gelöst:

TRIS	10,8 g/l
Borsäure	5,5 g/l
EDTA	0,9 g/l

Dann wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt.

**TE-Puffer**

TRIS	10 mM
EDTA	1 mM

Dann wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt.

**Elektrophoresepuffer**

TRIS	3 g/l
Glycin	14 g/l
<i>SDS</i>	1 g/l

Dann wurde der pH-Wert auf 8,3 eingestellt.

**Transformations-Puffer**

Folgende Chemikalien wurden in VE-Wasser gelöst:

PIPES	3,0 g/l
CaCl <sub>2</sub>	2,2 g/l
KCl	18,6 g/l

Nun wurde der pH-Wert auf 6,7 eingestellt und sterile filtrierte MnCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugegeben (10,8 g/l).

---

### 5.1.3. Genetik und *Thermal Shift Assay*

#### Geräte und Reagenzien

#### Hersteller

#### Dpn I

Aus dem QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit

*Agilent*

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase/  
Triosephosphatisomerase, aus Hasenmuskel

*Sigma Aldrich*

*MicroAmp-Fast-Optical* 48-Well-Platte

*Applied Biosystems*

PCR-Folie

*Applied Biosystems*

*Phusion® High-Fidelity* DNA Polymerase (2000 U/ml)

*BioLabs*

Plasmidkit

*Sigma Aldrich*

*StepOne Real-Time PCR* System

*Applied Biosystems*

Sequenzierungsdienstleister

*GATC Biotech AG*

*SyproOrange*-Lösung (5000x in DMSO)

*Life technologies*

#### Thermocycler

PCR System 9700

*GeneAmp™*

#### Vortexer

Minishaker MS1

*IKA*

#### 5.1.4. Screening

Geräte und Reagenzien	Hersteller
96-Well-Platten	<i>Sarstedt</i>
Acetatfolie für 96-Well-Platten	<i>Sarstedt</i>
Alkohol-Dehydrogenase (EC.: 1.1.1.1) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
Benzonase (EC.: 3.1.30.2)	<i>Sigma Aldrich</i>
Brutschrank	<i>WTB Binder</i>
<b>DC-Platten</b> TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> -Platten	<i>Merck KGaA</i>
<b>Densitometrische Analyse</b> TLC Scanner 4	<i>CAMAG</i>
Diaphorase (EC.: 1.8.1.4) aus <i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<b>Fluorimeter</b> <i>FLUOstar OPTIMA BMG</i>	<i>Labtech</i>
Glycerin-Dehydrogenase (EC.: 1.1.1.6) aus Kaninchenmuskel	<i>Roche</i>
Heißluftpistole	<i>Brüder Mannesmann</i> <i>Werkzeuge</i>
Inkubation von 96-Well-Deep-Well-Platte (2,2 ml) während Zellwachstum und Expression mittels <b>Ecotron</b>	<i>INFORS HT</i>
Inkubation von <i>Eppendorf</i> -Gefäßen mittels <b>Thermomixer 5436</b>	<i>Eppendorf</i>
Inkubationen von 96-Well-Platten mittels Mikrotiterplatten-Schüttler <b>Titramax 1000</b> mit angeschlossenem <b>Inkubator 1000</b>	<i>Heidolph</i>
Ionenaustauscher	<i>SERVA GmbH</i>
Lactat-Dehydrogenase (EC.: 1.1.1.27) aus Kaninchenmuskel	<i>Roche</i>
Lysozym 20 kU/mg	<i>GERBU Biotechnik GmbH</i>
Probenapplikation <i>HPTLC</i> mittels <i>Automatic TLC Sampler 4</i>	<i>CAMAG</i>

---

Quarzküvette

*Eppendorf*

Sorbitol-Dehydrogenase (EC.: 1.1.1.14) aus Schafsleber

*Sigma Aldrich*

**Spektrometer**

*Shimadzu*

UV-1800 Spektrometer

Trockenofen

*Heraeus*

VIVASPIN 500

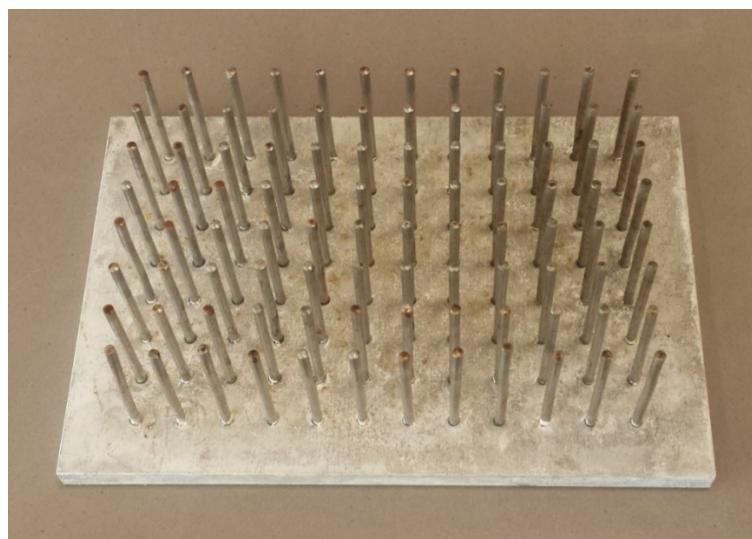
*Sartorius*

Vortexer

*MS1 Minishaker von IKA*

Zentrifuge

*Eppendorf*



**Abb. 104.** Metallstempel zum Inokulieren von 96-Well-Platten

### 5.1.5. Synthese

#### Geräte und Reagenzien

#### Hersteller

Argon-Gas 99,999 %

*AIR LIQUIDE* Deutschland GmbH

Dialyseschlauch MWC 14000

*Servapore*

Kieselgel 0,04–0,063 mm

*Carl Roth*

Molekularsiebe 3 Å

*Sigma Aldrich*

Proteinase K (EC.: 3.4.21.14) aus *Tritirachium album*

*Serva*

Saccharose

handelsüblich

### 5.1.6. Zellkultur und Enzymherstellung

#### Geräte und Reagenzien

#### Hersteller

Acrylamid Lösung

*Carl Roth*

Antischaumemulsion

Auf Silikonbasis von *Carl Roth*

Bisacrylamidlösung

*Carl Roth*

Bradford-Reagenz

*Carl Roth*

DNase >3200 U/mg

*GERBU Biotechnik GmbH*

Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

handelsüblich

Lyophilisator

*Telstar Lyo Quest*

Nickelsäule

*HisTrap* von *GE Healthcare*  
*Bio-Sciences AB*

SDS-Gelkammer

*Bio-Rad*

*Vivacell* 250 (Ultrafiltrationszelle)

*Sartorius Stedim Biotech AG*

Zentrifuge

*Eppendorf Centrifuge* 5415D,  
5804, 5810R

---

### 5.1.7. Zellkultur-Medien und Zellen

Allen Zellkulturmedien und Agar-Platten wurden direkt vor der Verwendung, wenn nicht anders beschrieben Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt.

#### AI-Medium (Auto-Induktions-Medium)<sup>[143]</sup>

Folgende Chemikalien wurden in VE-Wasser gelöst:

Hefeextrakt	5,55 g/l
Trypton	11,10 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	2,97 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,78 g/l
Glycerol	5,55 g/l
Glucose	0,55 g/l
Lactose	2,22 g/l

Die Lösung wurde autoklaviert. Vor ihrer Verwendung wurden folgende, steril filtrierte Lösungen hinzugegeben:

MgSO <sub>4</sub> (2 M)	1,1 ml/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)	44,4 ml/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	11,1 ml/l
Spurenelemente-Mix	1,1 ml/l

#### LB-Medium

Folgende Substanzen wurden in VE-Wasser gelöst:

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	5 g/l

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt, die Lösung wurde autoklaviert.

#### SOB-Medium

Folgende Substanzen wurden in VE-Wasser gelöst:

Peptone	20,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	0,6 g/l
KCl	0,2 g/l

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Lösungen hinzugegeben:

MgCl <sub>2</sub> (1M)	10 ml/l
MgSO <sub>4</sub> (1M)	10 ml/l

---

**TB-Medium**

Folgende Chemikalien wurden in VE-Wasser gelöst:

Hefeextrakt	24,0 g/l
Trypton	12,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,5 g/l

Die Lösung wurde autoklaviert. Vor Verwendung wurde Glycerol (4 ml, 85 %) hinzugegeben.

**Spurenelemente-Mix**

Zunächst wurde FeCl<sub>3</sub> (50 mM) in 0,1 M HCl (die Hälfte des späteren Gesamtvolumens) gelöst. Nun wurden folgende Chemikalien hinzugefügt:

CaCl <sub>2</sub>	(20 mM)
MnCl <sub>2</sub>	(20 mM)
ZnSO <sub>4</sub>	(10 mM)
CoCl <sub>2</sub>	(2 mM)
CuCl <sub>2</sub>	(2 mM)
NiCl <sub>2</sub>	(2 mM)

Anschließend wurde die Lösung auf das gewünschte Volumen mit VE-Wasser aufgefüllt und steril filtriert.

**BL21 (DE3)-Zellen** von *New England BioLabs*

Genotyp: fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRIB  
int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5

**XL-10 Gold-Zellen** von *Agilent*

Genotyp: TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1  
gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]

---



## 5.2. Kinetikmessungen mittels D-Fructose-6-phosphat-Assay

### 5.2.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### AAV. 1 Genexpression (AI-Medium)<sup>[143]</sup>

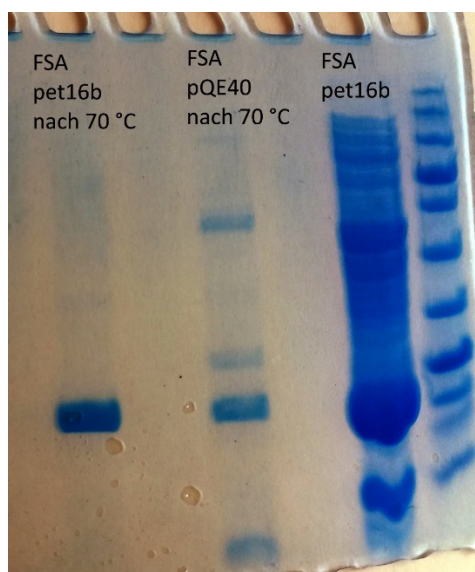
Die gewünschte Menge AI-Medium wurde in einen sterilen Schikanekolben gefüllt (max. 1/3 des Gesamtvolumens) und mit Antischaumemulsion (200 µl) versetzt. Anschließend wurde das Medium mit den gewünschten Zellen inokuliert und die Kolbenöffnung mit Aluminiumfolie verschlossen. Es erfolgte eine Inkubation für 22 h (37 °C, 210 rpm). Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (2254 g, 30 Min.) und der Überstand verworfen.

#### AAV. 2 Zellaufschluss (Lyse)

Die Zellen aus AAV. 1 wurden in TEA-Puffer (1/20 des Kulturvolumens, 50 mM, pH 8,3) resuspendiert, mit Lysozym (ca. 8000 U/ml Puffer) versetzt und eingefroren (-20 °C). Nun wurde die Probe bei RT aufgetaut, mit DNase (4 U/ml Puffer) versetzt und bei RT unter Rühren inkubiert. Nachdem die Flüssigkeit eine homogene Viskosität aufwies, wurde das Zelllysate zentrifugiert (2540 g, 30 Min.) und der Überstand für weitere Aufreinigungsschritte/Messungen verwendet.

#### AAV. 3 Hitzeaufreinigung der FSA<sup>[69]</sup>

Das Zelllysate aus AAV. 3. wurde mit DTT (2 mM) versetzt und für 20 Min. bei 70 °C im Wasserbad erhitzt. Nach einer Abkühlphase von 5 Min. wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation (16000 g, 10 Min.) entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß dekantiert und für Reaktionen oder weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Der DTT-Schritt wurde bei der FSA-Herstellung für die Kinetikmessungen weggelassen. Die Methode wurde mittels *SDS-PAGE* validiert (Abb. 105.)



**Abb. 105.** *SDS-PAGE* von FSA-Lysaten nach und vor der Hitzeaufreinigung. Die Expression erfolgte in zwei verschiedenen Vektoren. Helligkeit und Kontrast des Bildes wurden angepasst.

#### AAV. 4 Ultrafiltration

Die Proteinlösung wurde in eine geeignete Ultrafiltrationszelle gegeben, mit TEA-Puffer (50 mM, pH 8,3) auf 300 ml aufgefüllt und mittels Stickstoff einem Überdruck ausgesetzt (4 bar). Danach wurde die Zelle bei 4 °C inkubiert. Wenn das Volumen unter 4 ml abgesunken war, wurde ein zweites Mal TEA-Puffer (50 mM, pH 8,3) hinzugegeben und der Vorgang wiederholt. Wenn das Volumen erneut unter 4 ml gefallen war, wurde es entnommen und für weitere Experimente verwendet.

#### AAV. 5 Dialyse

Der Dialyseschlauch (MWC 10 kDa) wurde in einem Becherglas mit VE-Wasser (300 ml) gegeben und zum Sieden erhitzt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde er entnommen, mit Proteinlösung befüllt und an beiden Enden luftblasenfrei verknotet. Anschließend wurde er in ein großes Becherglas gegeben, welches mit TEA-Puffer (3 l, 50 mM, pH 7,5) befüllt wurde. Der Puffer wurde durch Rühren in Bewegung gehalten. Nach 16 h wurde der Dialyseschlauch entnommen und die Proteinlösung für weitere Schritte verwendet.

#### AAV. 6 Lyophilisieren von Proteinen und ganzen Zellen

Die das gewünschte Protein enthaltenden Zellen oder die das Protein enthaltende Lösung aus AAV. 1 bzw. AAV. 3 wurde in einen Rundkolben gegeben, welcher mindestens das doppelte Volumen der Lösung umfasste. Der Rundkolben wurde in Drehung versetzt (ca. 45 *rpm*) und in flüssigen Stickstoff getaucht. Nachdem die Abwesenheit von größeren Siedebblasen des Stickstoffes die vollständige Abkühlung des Rundkolbens anzeigte, wurde der Rundkolben mittels Lyophilisator lyophilisiert (48 h).

#### AAV. 7 Proteingehaltsbestimmung mittels Bradford-Test

Eichgerade:

In je 18 *Wells* einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden wurde *Bradford*-Reagenz (200 µl) gegeben. Nun wurde in je drei *Wells* jeweils 10 µl einer Proteinstandard-Lösung (*BSA*, 1; 0,5; 0,25; 0,10; 0,05; 0 mg/ml) gegeben und vorsichtig vermischt. Nach 3-minütiger Inkubation wurde die Absorption der *Wells* bei 595 nm gemessen<sup>[144]</sup>. Aus den Absorptionswerten wurde eine lineare Gleichung zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen erstellt.

Proteinbestimmung:

In je drei *Wells* einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden wurde *Bradford*-Reagenz (200 µl) gegeben und vorsichtig mit einer Proteinlösung vermischt (10 µl). Nach 3-minütiger Inkubation wurde die Absorption der *Wells* bei 595 nm gemessen. Der Wert wurde in die, durch die Eichgerade ermittelte Gleichung eingesetzt und so der Proteingehalt der Lösung berechnet.

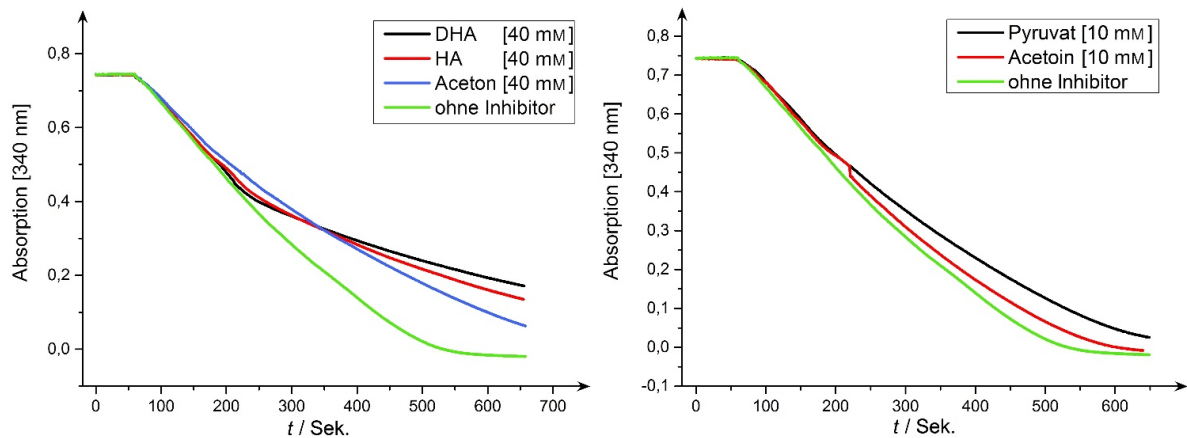
**AAV. 8 D-Fructose-6-phosphat-Assay<sup>[62]</sup>**

In einem Reaktionsgefäß wurde GlyGly-Puffer (50 mM, pH 7,0) mit D-F6P (30 mM) versetzt. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Nun wurde NADH (125 nM) sowie Triosephosphatisomerase (13,45-38,4 U/ml) und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (1,45-3,82 U/ml) hinzugegeben. Eine Quarzküvette wurde mit dieser Lösung befüllt und bei RT und 340 nm gegen eine mit GlyGly-Puffer (50 mM, pH 7,0) gefüllte Quarzküvette (Blindwert) für 60 Sek. vermessen. Nun wurde die Messung pausiert und vorsichtig eine FSA-Lösung (175 µg/ml) hinzugegeben und vermischt. Die Messung wurde fortgesetzt. Bei Messungen mit verschiedenen Bedingungen wurden alle Kurven (wenn möglich) auf die so gewonnene Standardkurve normiert.

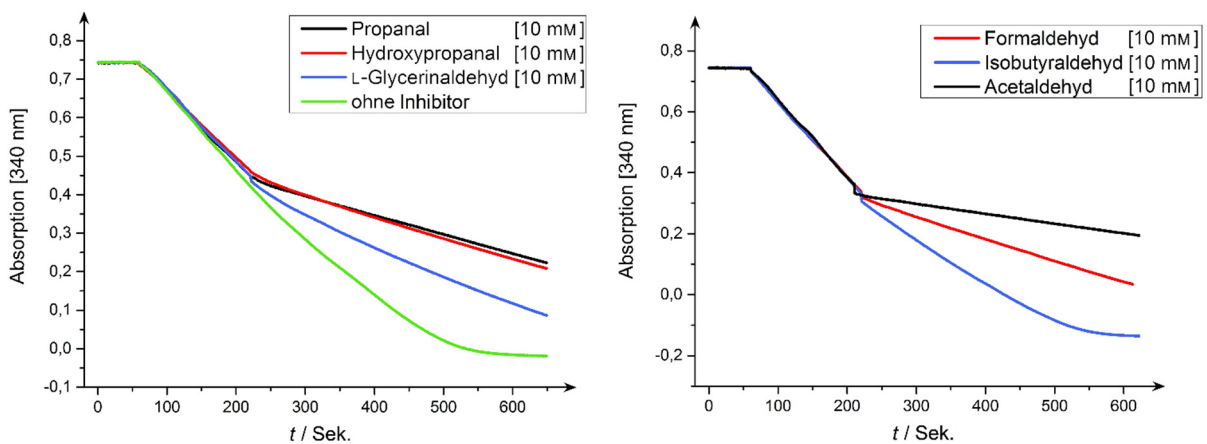
---

### 5.2.2. Einfluss von verschiedenen Aldehyden und Ketonen auf die FSA-Aktivität

Es wurden mehrere D-Fructose-6-phosphat-Assays (AAV. 8, 122  $\mu\text{g/ml}$  FSA) durchgeführt. Nach 140 Sek. wurde die Messung pausiert und verschiedene Keton- oder Aldehyd-Lösungen hinzugegeben und gemischt (Abb. 106. + Abb. 107.). Die Messung wurde für 430 Sek. fortgesetzt.



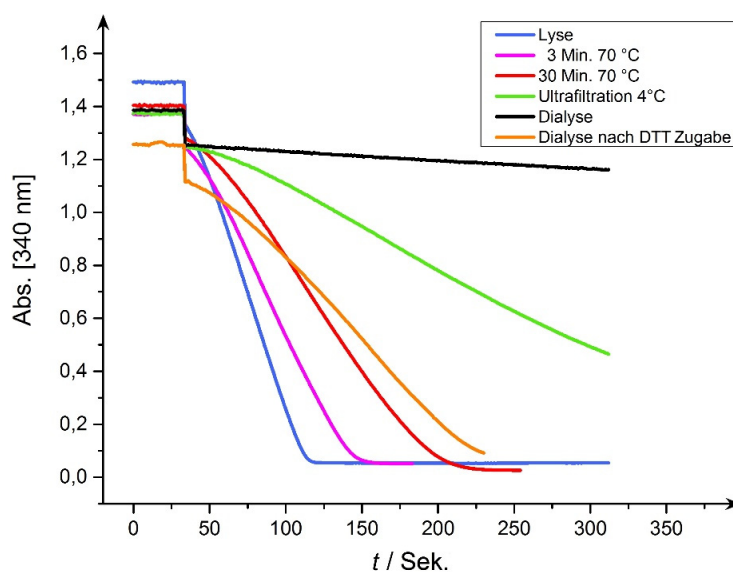
**Abb. 106.** FSA-Kinetik mit Zugabe verschiedener Ketone nach 220 Sek.



**Abb. 107.** FSA-Kinetik mit Zugabe verschiedener Aldehyde nach 220 Sek.. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Kurven auf eine gemeinsame Startabsorption normiert (daraus resultieren teilweise negative Absorptionswerte).

### 5.2.3. Einfluss von DTT auf die FSA-Aktivität

In BL21(DE3)- Zellen wurde *fsa* wt exprimiert (AAV. 1). Die Zellen wurden lysiert (AAV. 2, 170 mg FSA), aliquotiert (zu 2 ml, bzw. 4 ml für Dialyse und 8 ml für Ultrafiltration) und das Lysat auf verschiedene Arten aufgearbeitet (Tabelle 15.). Am Ende jedes Aufarbeitungsschrittes wurde die Probe bis zur endgültigen Aktivitätsmessung (Abb. 108.) eingefroren (-80 °C). Durch Hitzeaufreinigung entstandene Präzipitate wurden mittels Zentrifugation (16000 g, 5 Min.) entfernt. Da sich das Volumen der Proben im Laufe der unterschiedlichen Aufreinigungsschritte veränderte, wurde von jeder 100 µl entnommen und mit TEA-Puffer (50 mM, pH 8,3) auf 200 µl aufgefüllt. Davon wurden je 100 µl entnommen und für ein D-Fructose-6-phosphat-Assay (AAV. 8) verwendet (NADH 280 nm).



**Abb. 108.** FSA-Kinetik nach verschiedenen Proteinaufreinigungsschritten und nach Zugabe von DTT

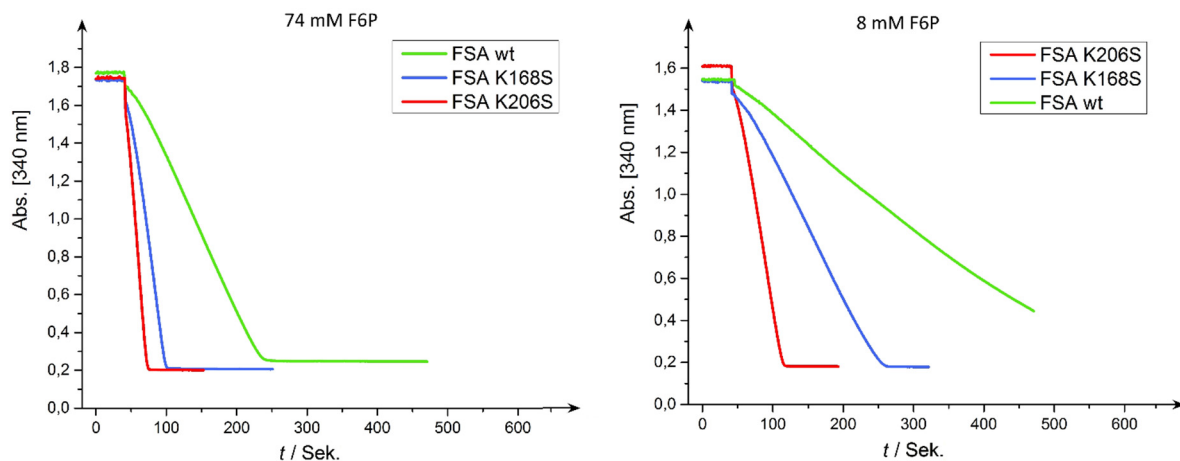
**Tabelle 15.** Einfluss von DTT auf die FSA-Aktivität nach verschiedenen Proteinaufreinigungsschritten

Aufarbeitungsschritt	FSA Aufarbeitungsschritte	Aktivität %, bezogen auf FSA nach der Lyse
A	FSA wt nach Lyse	100
B	Wie A und Inkubation für 5 Min. bei 70 °C	70
C	Wie A und Inkubation für 30 Min. bei 70 °C	45
D	Wie C und Ultrafiltration (AAV. 4) bei 4°C, über Nacht	18
E	Wie C nach Dialyse (AAV. 5) über Nacht (RT)	3
F	Wie E, danach Zugabe von DTT (2 mM), 1 h	30

Das gleiche Experiment wurde wiederholt. Es wurde jedoch von Anfang an DTT (2 mM) hinzugegeben, auch die Dialyselösung enthielt DTT (2 mM). Zwischen Probe A, B, C und D konnte dabei kein Aktivitätsunterschied festgestellt werden. Probe E wies nur noch 50 % der Aktivität auf. Probe C wurde danach aufgeteilt. Ein Teil wurde bei -20 °C eingefroren, der andere Teil wurde für 20 Tage inkubiert (RT). Der Aktivitätsverlust gegenüber der wieder aufgetauten Probe betrug 10 %.

#### 5.2.4. Einfluss von Lysinen in der Nähe des katalytischen Eingangs auf die FSA-Aktivität

Es wurden ein D-Fructose-6-phosphat-Assay (AAV. 8, 350 nM NADH, 122 µg/ml FSA) in GlyGly-Puffer (50 mM, pH 8,5) mit 8 mM und mit 74 mM D-F6P durchgeführt (178 µg FSA). Der Versuch wurde einmal mit FSA K168S (144 µg) und mit FSA K206S (214 µg) wiederholt (Abb. 109.). Das Experiment wurde bei verschiedenen D-F6P-Konzentrationen (8 mM oder 74 mM) durchgeführt. Die FSA-Aktivität wurde berechnet (Tabelle 16.)



**Abb. 109.** Vergleich der Kinetik verschiedener FSA-Varianten bei verschiedenen D-F6P-Konzentrationen

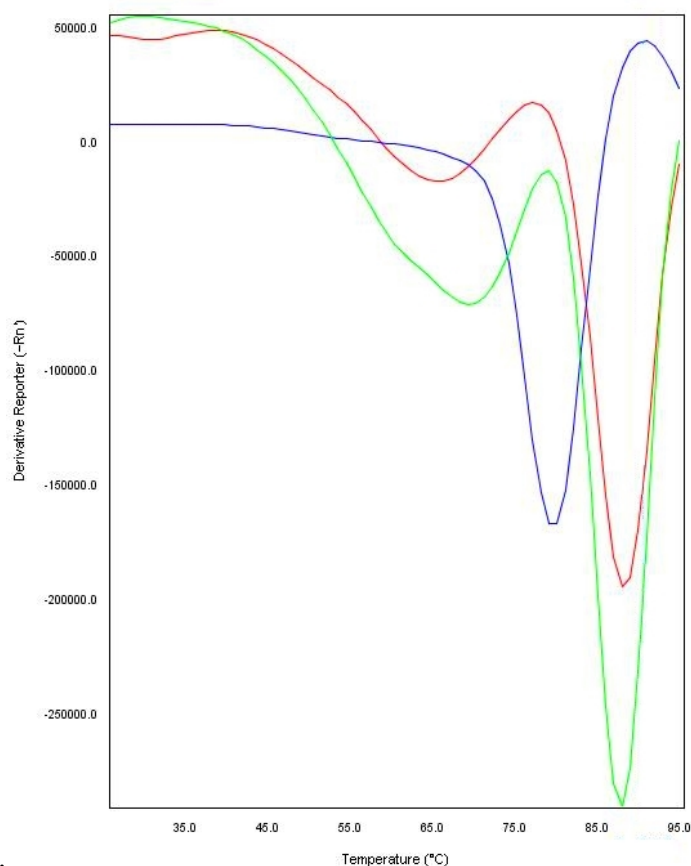
**Tabelle 16.** Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener FSA-Varianten bei verschiedenen D-F6P-Konzentrationen. Die Proteinkonzentration wurde auf 178 µg FSA normiert.

FSA-Variante	Aktivität mit 8 mM D-F6P in % bezogen auf FSA wt 8 mM D-F6P	Aktivität mit 74 mM D-F6P in % bezogen auf FSA wt 74 mM D-F6P
FSA wt	100	100
FSA K168S	278	497
FSA K206S	658	688

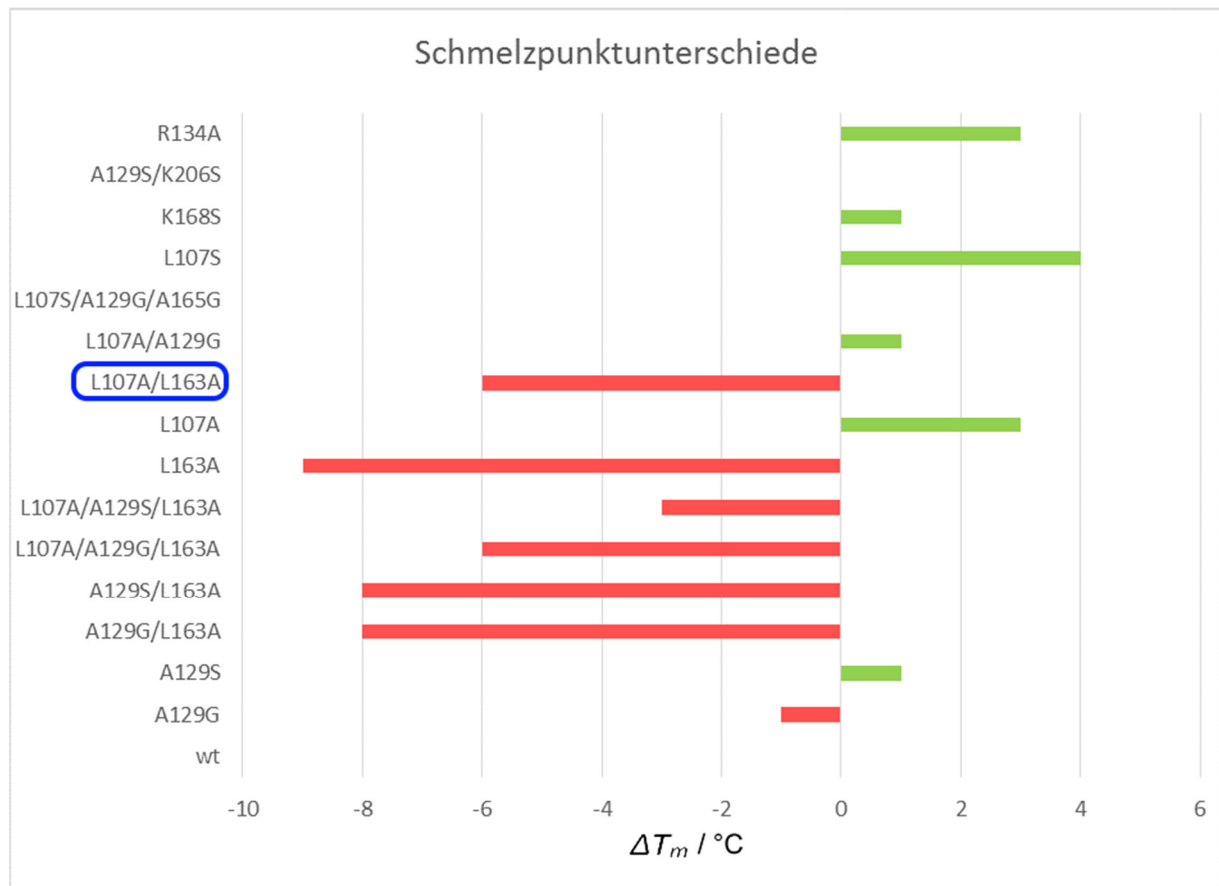
### 5.3. Thermostabilität verschiedener FSA-Varianten

#### 5.3.1. Thermal-Shift-Assay verschiedener FSA-Varianten

In eine *MicroAmp-Fast-Optical* 48-Well-Platte wurde FSA-Proteinlösung (1-20 µg FSA), *SyproOrange*-Lösung (10 µl, 1:100 verdünnt) und HEPES-Puffer (22,5 µl, 100 mM, 150 mM NaCl, pH 8) gegeben. Die Platte wurde mit *PCR*-Folie versiegelt und zentrifugiert (563 g, 2 Min.). Es erfolgte eine Messung mittels *Real-Time-PCR* bei einem Temperaturanstieg von 1 °C/30. Sek von 25 °C - 95 °C. Die Anregungswellenlänge war 480 nm, die Fluoreszenz wurde durch einen 605 nm Filter gemessen<sup>[140,141]</sup>. Die Auswertung erfolgte durch die *StepOne* 2.0 Software (Abb. 110., Abb. 111, Tabelle 17.).



**Abb. 110.** Schmelzkurven-Diagramm (1. Ableitung) ausgewählter FSA-Varianten aus der Gruppe von Clapés *et al.* Grün ist FSA wt, blau ist FSA L163A, rot ist A129S.



**Abb. 111.** Schmelzpunkttemperaturen verschiedener FSA-Varianten aus der Zusammenarbeit mit der Gruppe von Clapés *et al.*. Positive (grüne) Werte bedeuten eine Zunahme, negative (rote) Werte eine Abnahme der Proteinstabilität<sup>[47]</sup>.

**Tabelle 17.** Schmelzpunkttemperaturen verschiedener FSA-Varianten

FSA-Variante	$T_m$ [°C]
wt	87
A129G	86
A129S	88
A129G/L163A	79
A129S/L163A	79
L107A/A129G/L163A	81
L107A/A129S/L163A	84
L163A	78
L107A	90
L107A/L163A	81
L107A/A129G	88
L107S/A129G/A165G	87
L107S	91
K168S	88
A129S/K206S	87
R134A	90



## 5.4. Erstellung von FSA-Mutanten und FSA-Bibliotheken

### 5.4.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Alle erstellten *fsa*-Mutanten wurden als Glycerolstock (AAV. 13) für weitere Experimente bei -80 °C gelagert. Von jedem erstellten Glycerolstock wurde eine Plasmidsequenzierung angefertigt, um seine genetische Uniformität zu überprüfen (AAV. 11 und 15). LB-, TB- und AI-Medien enthielten immer ein plasmidspezifisches Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration.

### AAV. 9 Primerdesign und Bezugsquelle

Alle Primer wurden mit dem *QuikChange Primer Design Webtool* von *Agilent*<sup>[145]</sup> designt. Die Synthese der Primer wurde bei *Sigma Aldrich* oder bei *Biomers* in Auftrag gegeben. Als Aufreinigungsmethode seitens des Herstellers wurde entweder *HPLC* oder Umkehrphasen-Chromatographie verwendet. Alle Primer wurden mit sterilem VE-Wasser auf 100 pmol/μl verdünnt und bei -80 °C gelagert.

### AAV. 10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Erstellung von Enzymmutanten

Für alle *PCR*-Reaktionen wurde das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* von *Agilent* verwendet. Die Polymerase wurde durch die *Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase* von *New England Biolabs* ersetzt. Für eine *PCR* wurden folgende Lösungen - wie in Tabelle 18. beschrieben - in ein *PCR*-Gefäß (200 μl) pipettiert:

**Tabelle 18.** Standard Ansatz für die *PCR*

Lösung	[μl]
<i>QuikChange-Lightning</i> -Puffer (10-fach)	2,50
Plasmid	0,50 (5-50 ng DNA)
Primer <i>forward</i>	0,50 (50 ng DNA)
Primer <i>revers</i>	0,50 (50 ng DNA)
dNTP Mix	2,00 (2 mM)
<i>Quick Solution</i>	0,75
Steriles Wasser (DNA frei)	18,25

Dann wurde der *Thermocycler* auf 90 °C vorgewärmt. Anschließend wurde *Phusion*-Polymerase (0,5 μl, 2 U/μl) in das *PCR*-Gefäß gegeben. Es wurde durch Vortexen gemischt und im *Thermocycler* folgendem Programm unterworfen (Tabelle 19.):

**Tabelle 19.** *PCR-Programm*

Segment	Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [Sek.]	
1	1	95	30	
2	18	95	20	
2	18	60	10	
2	18	68	30	pro kB des DNA- Templates
3	1	68	300	Anschließend abkühlen auf 4 °C

Anschließend wurde *Dpn* I (10 U) hinzugegeben, gemischt und für 15 Min. inkubiert (37 °C). Die Plasmidlösung wurde zum Transformieren von *E. coli* Zellen verwendet.

### AAV. 11 Plasmidisolation

Für die Plasmidisolation wurde das *GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit* von *Sigma Aldrich* (nach Anweisung des Herstellers) verwendet. Hierfür wurde ein mit LB-Medium (1,6 ml) gefülltes *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) mit dem das gewünschte Plasmid enthaltendem Bakterium inokuliert. Dies erfolgte mit einem sterilen Zahnstocher entweder von einer Kolonie aus einer Agarplatte oder direkt aus einem Glycerolstock. Mithilfe einer Spritzenspitze wurde ein Loch (ca. 2 mm) in den Deckel des *Eppendorf*-Gefäßes gestochen. Nun wurde dieses für 18 h inkubiert (37 °C, 900 *rpm*) und anschließend zentrifugiert (12000 g, 60 Sek.). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Resuspensionspuffer resuspendiert, mit Lysepuffer versetzt und nach 5 Min. mit Neutralisationspuffer gequenchet. Die Zelltrümmer wurden pelletiert, der Überstand in eine vorher präparierte DNA-Bindesäule dekantiert. Diese wurde zweimal mit Waschlösung gereinigt. Das Plasmid wurde mit Elutionslösung (45 µl) eluiert (ca. 200-400 ng DNA/µl) und direkt zum Sequenzieren, für eine *PCR* oder zum Transformieren von *E. coli* Zellen verwendet.

### AAV. 12 Agarosegel

In einem Erlenmeyerkolben wurde TBE (40 ml, 0,5-fach konzentriert) und Agarose (2 % für Primeranalysen, 0,5% bei Plasmidanalysen) vermischt. Die Suspension wurde zum Sieden erhitzt, bis die Agarose aufgelöst war. Nach Abkühlung (auf ca. 50 °C) wurde Ethidiumbromid (0,28 ng/ml, 0,71 nM) hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen, welche nach dem Erstarren der Flüssigkeit mit TBE-Puffer befüllt wurde, so dass das Gel ca. 5 mm mit Flüssigkeit bedeckt war. Nun wurden die DNA-Proben (10 µl/Tasche) aufgetragen. An die Kammer wurde eine Spannung (90 V, 45 Min.) angelegt. Das Gel wurde nun entnommen und unter UV-Licht ausgewertet. Die DNA-Probe bestand aus Plasmid (aus AAV. 10/11, ca. 200-400 ng DNA), *SDS PAGE*-Probenpuffer (2 µl) und TBE-Puffer (10 µl).

### AAV. 13 Anlegen von Glycerol-Stocks (in Eppendorf-Gefäßen)

Ein *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) wurde mit LB-Medium (1,6 ml) befüllt und mit den gewünschten Zellen inokuliert. Es wurde ein Loch (2 mm) in den Deckel gestoßen; nun erfolgte eine Inkubation für 16 h (37 °C, 900 rpm). Anschließend wurde steriles Glycerol hinzugegeben (300 µl, 85 %). Der Inhalt wurde sodann gut durchmischt, in ein neues Gefäß gegeben und bei -80 °C gelagert. Gleichzeitig wurde eine kleine Menge entnommen und sequenziert (AAV. 11/15), um die Genidentität des Klons zu bestätigen.

### AAV. 14 Anlegen von Glycerol-Stocks (96-Well-Platten)

Eine 96-Well-round-bottom-Platte wurde mit LB-Medium befüllt (130 µl/Well). Jedes Well wurde mit dem gewünschten Klon inokuliert. Die Platte wurde mit Acetat-Folie verschlossen; über jedes Well wurde ein Loch gestoßen (2 mm). Die Mikrotiterplatte wurde bei 37 °C inkubiert (900 rpm, 18 h). Die Folie wurde entfernt, in jedes Well wurde Glycerol-Lösung (50 %, 32 µl) gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde durchmischt (1000 rpm, 20 Sek.), mit Acetat-Folie verschlossen und bei -80 °C gelagert.

### AAV. 15 Sequenzierung von Plasmiden

Zum Sequenzieren von isolierten Plasmiden wurde ein Teil der Plasmidlösung (5 µl, ca. 100 ng/µl DNA) mit einer der folgenden plasmidspezifischen Primerlösung (5 µM) gemischt und zum Sequenzieren versandt.

Primer	Sequenz
T7-Vektro ( <i>Forward</i> )	5'–CGATCCCGCGAAATTAATACG–3'
T7-Vektor ( <i>Reverse</i> )	5'–CCTCAAGACCCGTTTAGAGG–3'
T5-Vektro ( <i>Forward</i> )	5'–CCCGAAAAGTGCCACCTG–3'

Je nach Position der zu erwartenden Mutation wurde der *Forward*- oder der *Reverse*-Primer verwendet. Die Sequenzen wurden mit dem Programm *Chromas Lite* 2.01<sup>[146]</sup> ausgelesen und mit dem Programm *ApE* 2.0.44 analysiert<sup>[147]</sup>.

### AAV. 16 Agarplatten

In eine *Duran*-Glasflasche (500 ml) wurde LB-Medium (100 ml), Agar (1,5 g) und VE-Wasser (10 ml) gegeben. Der Deckel wurde lose auf die Flasche geschraubt; anschließend wurde die Flüssigkeit zum Sieden erhitzt. Nun wurde die Flasche leicht geschwenkt und der Inhalt erneut erhitzt bis der Agar gelöst wurde. Nach Abkühlen der Lösung (ca. 60 °C) wurde sie mit Antibiotikum versetzt und zum Gießen von Agarplatten verwendet<sup>[148]</sup>.

**AAV. 17 Herstellung von kompetenten BL21 (DE3)-Zellen**

Ein *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) wurde mit LB-Medium (1,5 ml) befüllt und mit BL21 (DE3)-Zellen inokuliert. Es wurde ein Loch in den Deckel der Gefäße gestoßen (2 mm); nun erfolgte eine Inkubation für 16-18 h (37°C, 900 *rpm*). Die Zellsuspension wurde in einen Schikanekolben mit SOB-Medium (250 ml) überführt. Diese wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 inkubiert (37°C, 200 *rpm*). Die Zellen wurden nun auf Eis inkubiert (10 Min.) und das Medium durch Zentrifugation (2000 g, 4 °C, 10 Min.) entfernt. Nun wurden die Zellen in kalten Transformations-Puffer (80 ml) resuspendiert und auf Eis inkubiert (10 Min.). Der Puffer wurde durch erneutes Zentrifugieren (2000 g, 4 °C, 10 Min.) entfernt. Die Zellen wurden in frischen, kalten Transformations-Puffer (20 ml) vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis (10 Min.) wurde DMSO (1 M) und DTT (75 mM) hinzugegeben. Je 200 µl der Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes *Eppendorf*-Gefäß gegeben. Dieses wurde in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei -80°C gelagert.<sup>[149]</sup>

**AAV. 18 Transformation kompetenter XL10-Gold *E. coli* Zellen**

Die Transformation erfolgt nach der Anleitung des *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits* von *Agilent*. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut (10-12 Min.), mit β-Mercaptoethanol (2 µl) versetzt und vorsichtig durchmischt. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis (2 Min.). Nun wurde isoliertes Plasmid (2 µl) oder PCR-Produkt (2 µl) oder ligiertes Plasmid (2-5 µl) hinzugegeben und vorsichtig durchmischt. Die Probe wurde auf Eis inkubiert (30 Min.) und anschließend einem Hitzeschock (42 °C, 30 Sek.) ausgesetzt. Es erfolgt eine Inkubation auf Eis (5 Min.). Nun wurden die Zellen mit SOC-Medium (500 µl, 42 °C) versetzt. Nach einstündiger Inkubation (37 °C, 900 *rpm*) wurde 100 µl dieser Zellsuspension auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die restliche Suspension wurde zentrifugiert (20 Sek., 16000 g) und die Flüssigkeit dekantiert. Das Pellet wurde in der nicht dekantierbaren Restflüssigkeit resuspendiert und ebenfalls auf eine Agarplatte ausgestrichen. Diese wurden für 18 h (bei 37 °C) oder für 66 h (bei RT) inkubiert. Die Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und zur Inokulation von Nährmedien verwendet.

**AAV. 19 Transformation kompetenter BL21(DE3) *E. coli* Zellen**

Siehe AAV. 18 statt XL10-Gold Zellen wurden BL21(DE3) Zellen verwendet, der β-Mercaptoethanol Schritt wurde weggelassen.

#### 5.4.2. Herstellung von FSA L107A/L163A

Zur Erstellung der *fsa*-Mutante L107A/L163A wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* L107A in pQE40 (Quelle: Arbeitskreis Pere Clapés) und folgenden Primern durchgeführt:

5'– TTGAAACTCGCTGCC**GC**CACTTTCGCCTGCGG –3'  
 5'– CCGCAGGCGAAAGTG**GC**GGCAGCGAGTTTCAA –3'

Es erfolgte eine Transformation von BL21(DE3) Zellen (AAV. 19).

#### 5.4.3. Herstellung von FSA K168S

Zur Erstellung der *fsa*-Mutante K168S wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* wt in pET-16b und folgenden Primern durchgeführt:

5'–GTGCTGGCAGCGAGTTTCA**GC**ACCCCGCGT–3'  
 5'–GACGCGGGGT**GCT**GAAACTCGCTGCCAGCAC–3'

Es erfolgte eine Transformation von BL21(DE3) Zellen (AAV. 19).

#### 5.4.4. Herstellung von FSA K206S

Zur Erstellung der *fsa*-Mutante K206S wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* wt in pET-16b und folgenden Primern durchgeführt:

5'–CCAGTCCTGCTCAAA**GCT**CGCCACAGCGGCAT–3'  
 5'–ATGCCGCTGTGGCGA**GCT**TTTGAGCAGGACTGG–3'

Es erfolgte eine Transformation von BL21(DE3) Zellen (AAV. 19).

#### 5.4.5. Herstellung von FSA A165G/T185A

Zur Erstellung der *fsa*-Mutante A165G wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* wt in pET-16b und folgenden Primern durchgeführt:

5'– GGGGTTTTGAAACT**CC**CTGCCAGCACTTTCG–3'  
 5'– CGAAAGTGCTGGCAG**G**GAGTTTCAAAACCC–3'

Es erfolgte eine Transformation von XL10-Gold Zellen (AAV. 18) und ein Auspaltieren auf eine Agarplatte (AAV. 16). Von drei Kolonien wurde eine Plasmidisolation (AAV. 11) mit anschließender Sequenzierung (AAV. 15), durchgeführt.

Zur Erstellung der *fsa*-Mutante A165G/T185A wurde mit dem so erhaltenen Plasmid eine *PCR* (AAV. 10) mit folgenden Primern durchgeführt:

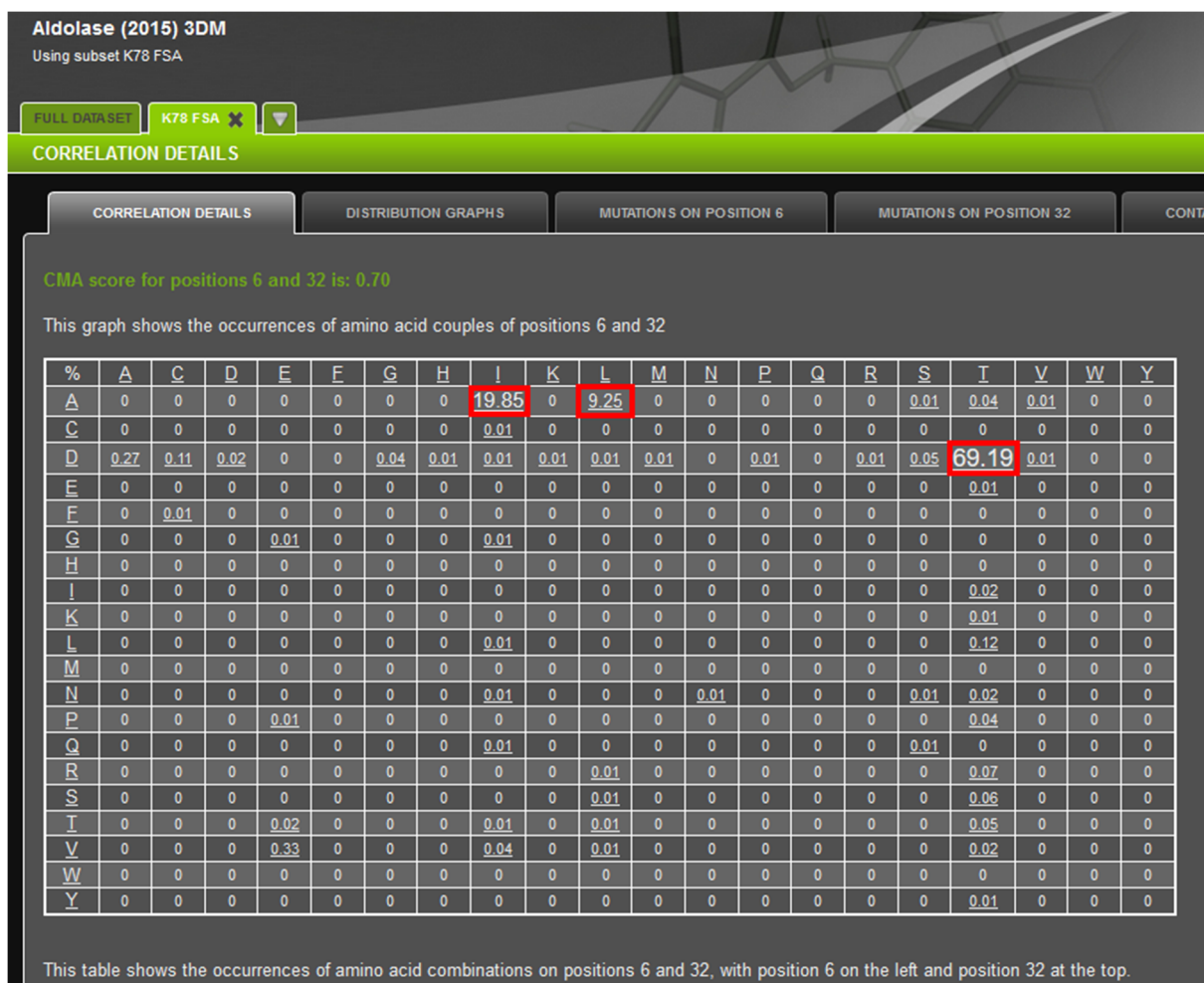
5'– CCAGTGGCAGAGCAATTGATTACATCCTGCCAGT–3'

5'– ACTGGCAGGATGTGAATCAATTGCTCTGCCACTGG–3'

Es erfolgte eine Transformation von BL21(DE3) Zellen (AAV. 19).

#### 5.4.6. Vorhersage von möglichen positiven FSA-Varianten mittels 3DM von *Bio-product*

Zur Analyse wurde von *Bio-product* (<https://3dm.bio-product.nl/>) eine Datenbank mit Aldolasen erstellt. Es wurde eine Untergruppe mit allen Aldolasen erstellt, welche an Position 78 ein Lysin enthalten. Dieses Lysin entspricht der Position K85 in der FSA und stellt das katalytisch aktive Lysin dar. In dieser Subgruppierung wurde die Korrelationsmatrix von Position 6 mit Position 32 (entspricht T26 in FSA) betrachtet (Abb. 112.). Die Variante D6/T32 kommt in 69,19 % der Aldolasen der ausgewählten Gruppierung vor, die Variante A6/T26I in 19,85 % der Aldolasen.



**Abb. 112.** Korrelationsmatrix des 3DM-Programms für Position 6 und 32 in der Untergruppe der Aldolase-Superfamilie, welche an Position 78 ein Lysin besitzt.

#### 5.4.7. Herstellung von FSA D6A/T26I

Zur Erstellung der *fsa*-Mutante D6A wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* wt in pET-16b und folgenden Primern durchgeführt:

5'– GCAACAACGTCTGAAGTA**G**CCAGATACAGTTCCATGG–3'  
 5'– CCATGGAACTGTATCTGG**C**TACTTCAGACGTTGTTGC–3'

Es erfolgte eine Transformation in XL10-Gold Zellen (AAV. 18) und ein Ausplattieren auf eine Agarplatte (AAV. 16). Von drei Kolonien wurde eine Plasmidisolation (AAV. 11) mit anschließender Sequenzierung (AAV. 15) durchgeführt. Zur Erstellung der FSA-Variante D6A/T26I wurde mit dem so erhaltenen Plasmid *fsa* D6A in pET-16b eine *PCR* (AAV. 10) mit folgenden Primern durchgeführt:

5'– TGCTTGGGTTAGTG**A**TCACACCCGCCAGC–3'  
 5'– GCTGGCGGGTGTGAT**T**CACTAACCCAAGCA–3'

Es erfolgte eine Transformation in BL21(DE3) Zellen (AAV. 19).

#### 5.4.8. Erstellung der FSA-Bibliotheken D6L/N28X

Zur Erstellung der D6L/N28X-Bibliothek wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* D6L in pET-16b und folgenden Primern durchgeführt:

5'– GCGATAATGCTTGG**SNN**AGTGGTCACACCCGCCAGCGG –3'  
 5'– CCGCTGGCGGGTGTGACCACT**NNS**CCAAGCATTATCGC –3'

Es erfolgte eine Transformation in XL10-Gold Zellen (AAV. 18). Alle Kolonien (Anzahl > 100) wurden mit einem zur Platte waagrecht gehaltenen Zahnstocher aufgenommen und in einem *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) mit LB-Medium (1,6 ml) resuspendiert. Es wurde eine Plasmidisolation (AAV. 11) durchgeführt, der Plasmidmix wurde sequenziert (AAV. 15) und zur Transformation von BL21(DE3) Zellen verwendet (AAV. 19). Von 96 Kolonien wurde eine Masterplatte erstellt (AAV. 14).

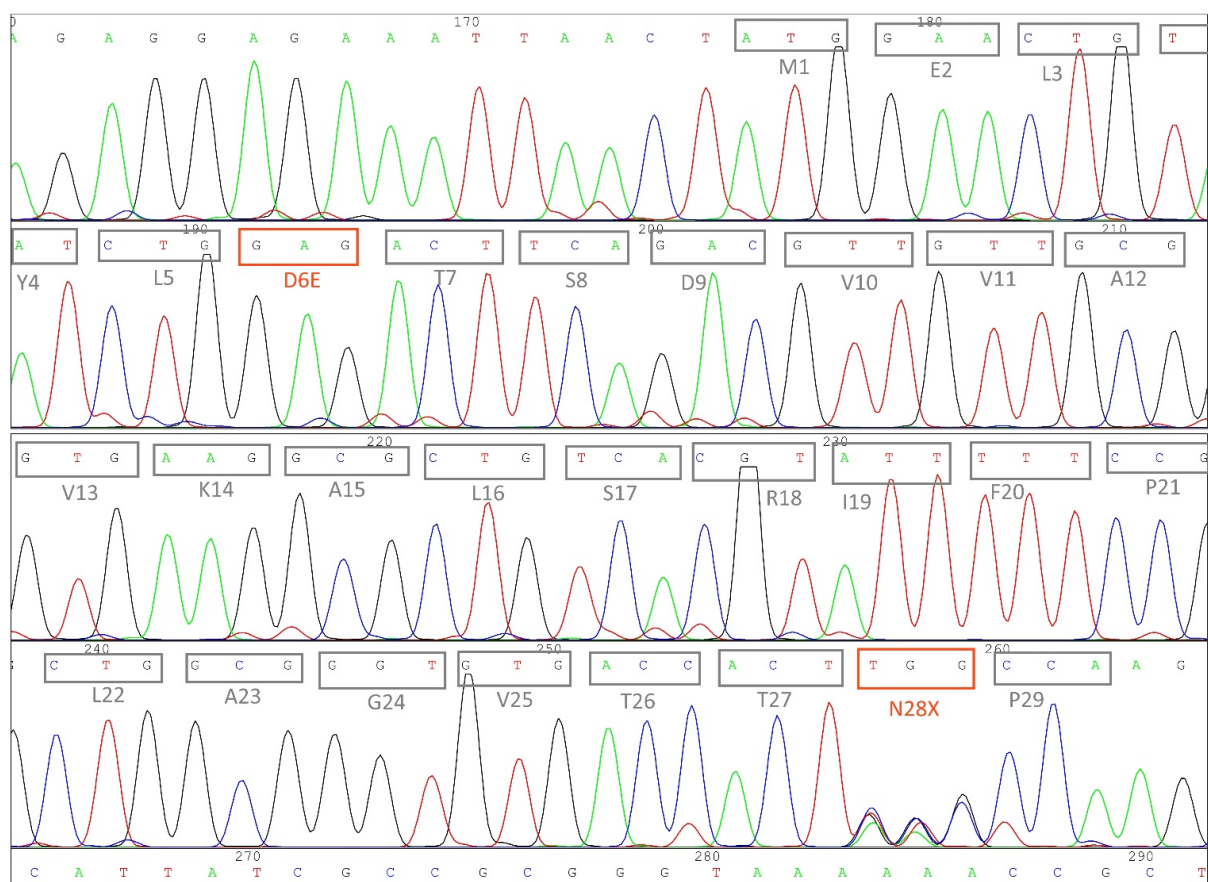
### 5.4.9. Erstellung der FSA-Bibliotheken D6E/N28X

Zur Erstellung der D6E/N28X Bibliothek wurde eine PCR (AAV. 10) mit dem Plasmid *fsa* D6E pQE40 und folgenden Primern durchgeführt:

5'- GCGATAATGCTTGG**SNN**AGTGGTCACACCCGCCAGCGG -3'

5'- CCGCTGGCGGGTGTGACCACT**NNS**CCAAGCATTATCGC -3'

Es erfolgt eine Transformation von XL10-Gold Zellen (AAV. 18). Alle Kolonien (Anzahl > 100) wurden mit einem zur Platte waagrecht gehaltenen Zahnstocher aufgenommen und in einem *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) mit LB-Medium (1,6 ml) resuspendiert. Es wurde eine Plasmidisolation (AAV. 11) durchgeführt, der Plasmidmix wurde sequenziert (AAV. 15) (Abb. 113.) und zur Transformation von BL21(DE3) Zellen verwendet (AAV. 19).



**Abb. 113.** Elektropherogramm des zur Erstellung der FSA D6E/N28X Mutanten-Bibliothek verwendeten Plasmidmixes. Die Codons der Aminosäuren sind grau markiert; die daraus resultierenden Aminosäuren sind mit ihrer Positionsnummer im Einbuchstabencode eingetragen. Mutationen sind orange markiert.

Es erfolgte eine Transformation von BL21(DE3)-Zellen (AAV. 19). Von 96 Kolonien wurde eine Masterplatte erstellt (AAV. 14).



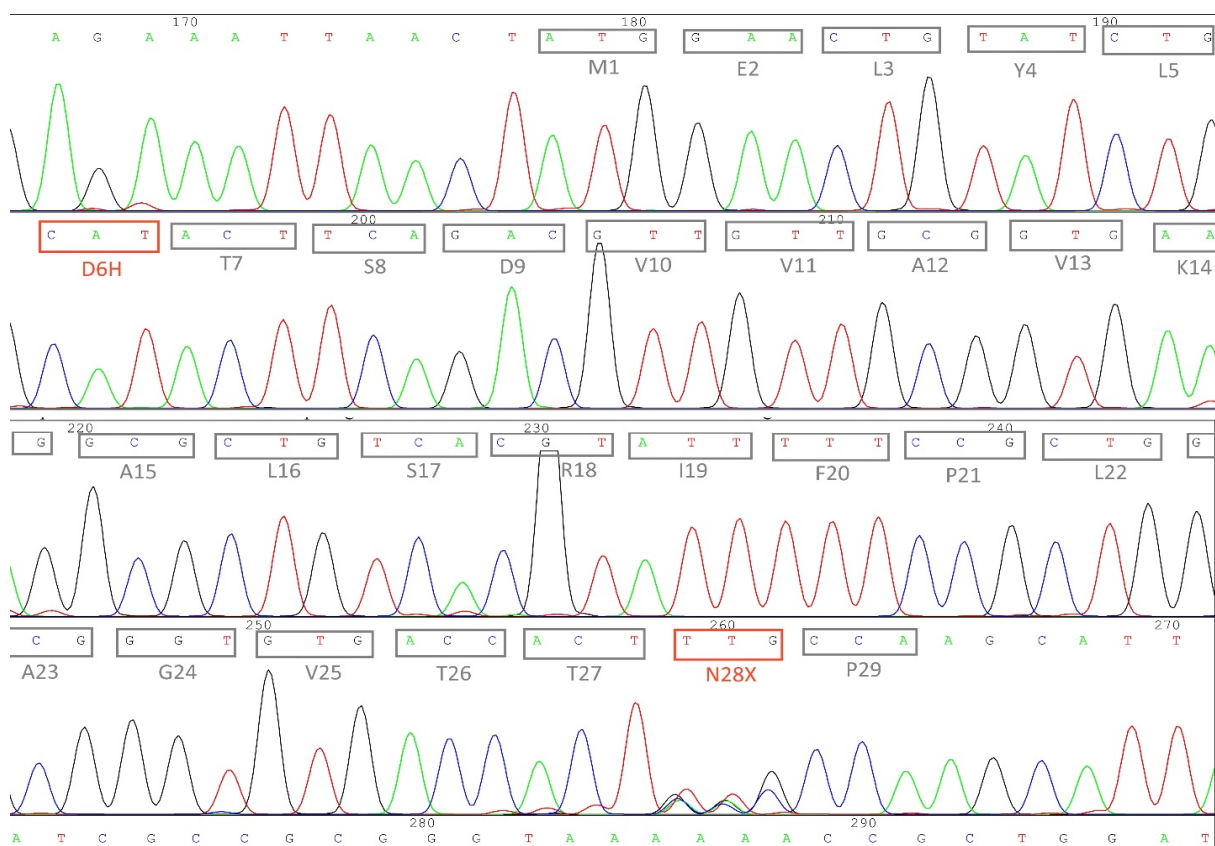
### 5.4.10. Erstellung der FSA-Bibliotheken D6H/N28X

Zur Erstellung der D6H/N28X-Bibliothek wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* in D6H pQE40 und folgenden Primern durchgeführt:

5'- GCGATAATGCTTGG**SNN**AGTGGTCACACCCGCCAGCGG -3'

5'- CCGCTGGCGGGTGTGACCACT**NNS**CCAAGCATTATCGC -3'

Es erfolgte eine Transformation von XL10-Gold Zellen (AAV. 18). Alle Kolonien (Anzahl > 100) wurden mit einem zur Platte waagrecht gehaltenen Zahnstocher aufgenommen und in einem *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) mit LB-Medium (1,6 ml) resuspendiert. Es wurde eine Plasmidisolierung (AAV. 11) durchgeführt, der Plasmidmix wurde sequenziert (AAV. 15, Abb. 114.) und zur Transformation von BL21(DE3)-Zellen verwendet (AAV. 19).



**Abb. 114.** Elektropherogramm des zur Erstellung der FSA D6H/N28X Mutanten-Bibliothek verwendeten Plasmidmix. Die Codons der Aminosäuren sind grau markiert, die daraus resultierenden Aminosäuren sind mit ihrer Positionsnummer im Einbuchstabencode eingetragen. Mutationen sind orange markiert.

### 5.4.11. Erstellung der FSA-Bibliotheken D6X/T26X

Zur Erstellung der D6X/T26X Bibliothek wurde eine *PCR* (AAV. 10) mit *fsa* wt in pET-16b und folgenden Primern durchgeführt, welcher die Mutationen an Position 6 erzeugte:

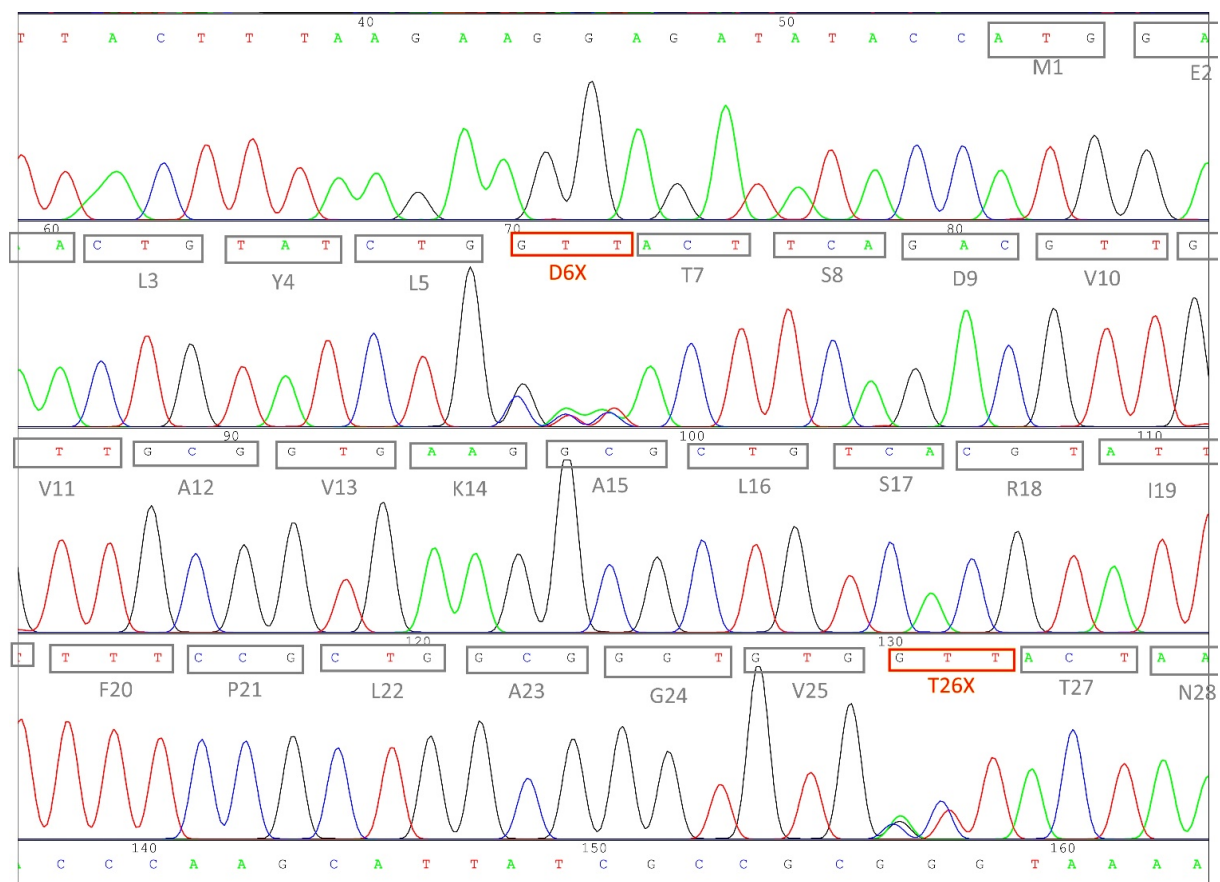
5'- TTCACCGCAACAACGTCTGAAGT**DD**SCAGATACAGTTCCATGGTATATC -3'  
 5'- GATATACCATGGAACTGTATCTG**SHH**ACTTCAGACGTTGTTGCGGTGAA -3'

Es erfolgte eine Transformation von XL10-Gold Zellen (AAV. 18). Alle Kolonien (Anzahl > 100) wurden mit einem zur Platte waagrecht gehaltenen Zahnstocher aufgenommen und in einem *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) mit LB-Medium (1,6 ml) resuspendiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert (900 *rpm*). Es wurde eine Plasmidisolation (AAV. 11) durchgeführt.

Mit diesem Plasmidmix erfolgt eine zweite *PCR* (AAV. 10) mit folgenden Primern, die die Mutationen an Position 26 einfügen:

5'- GCGATAATGCTTGGGTTAGT**ARB**CACACCCGCCAGCGGAAAAA -3'  
 5'- TTTTTCGCTGGCGGGTGTG**VYT**ACTAACCCAAGCATTATCGC -3'

XL10-Gold Zellen (AAV 18) wurden mit dem *PCR*-Produkt transformiert. Alle Kolonien (Anzahl > 200) wurden mit einem, zur Platte waagrecht gehaltenen Zahnstocher aufgenommen und in einem *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) mit LB-Medium (1,6 ml) resuspendiert. Es wurde eine Plasmidisolation (AAV. 11) durchgeführt, der Plasmidmix wurde sequenziert (AAV. 15, Abb. 115.).



**Abb. 115.** Elektropherogramm des zur Erstellung der FSA D6X/T26X Mutanten-Bibliothek verwendeten Plasmidmixes. Die Codons der Aminosäuren sind grau markiert, die daraus resultierenden Aminosäuren sind mit ihrer Positionsnummer im Einbuchstabencode eingetragen. Mutationen sind orange markiert.

Der isolierte Plasmidmix wurde zur Transformation von BL21(DE3)-Zellen verwendet (AAV. 19). Von zweimal 92 Kolonien wurde eine Masterplatte erstellt (AAV. 14). Position H1 und H2 der Masterplatte wurde mit *fsa* D6H als Positivkontrolle, H3 und H4 mit *fsa* wt als Negativkontrolle inokuliert. Es wurden Masterplatten erstellt (AAV. 14).

---

## 5.5. Entwicklung eines kolorimetrischen Hochdurchsatz-Screenings

### 5.5.1. Allgemeine Arbeitsanweisungen

#### AAV. 19 Nickel-Affinitätschromatographie

Die das gewünschte Protein enthaltenden Zellen (AAV. 1) wurden durch Zentrifugation (2254 g, 30 Min.) pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Phosphat-Puffer (1/20 des Zellkulturvolumens, 20 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4) resuspendiert, mit Lysozym (4000 U/ml Puffer) versetzt und eingefroren (-80 °C). Nach dem Auftauen bei RT wurde DNase (4 U/ml Puffer) hinzugegeben, die Probe wurde bis zur normalen Viskosität geschüttelt. Nach der Zentrifugation (4000 g, 7 Min.) wurde Imidazol (30 mM) hinzugegeben. Die Proteinlösung wurde auf eine Nickel-NTA-Säule gegeben. Diese wurde mit Imidazol-Puffer (50 ml, 20 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7,4) gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit Phosphatpuffer (20 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4) bis der Säulenausfluss einen pH-Wert von 7,4 aufwies. Nun wurde der Enzym-Nickelkomplex mit EDTA-Puffer (20 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 50 mM EDTA pH 7,4) eluiert und der pH-Wert des Eluates auf pH 8,0 eingestellt. Es erfolgte eine Ultrafiltration (AAV. 4) mit dem gewünschten Puffer.

#### AAV. 20 SDS-PAGE 14 %

Zur Herstellung eines *SDS-PAGE*-Gels wurde zunächst Acrylamid-Lösung (3,11 ml, 30 %), Bisacrylamid-Lösung (1,33 ml, 2 %) TRIS-Puffer (3,75 ml, 1 M, pH 8,7), *SDS*-Lösung (33 µl, 20 %) und TEMED (10 µl) miteinander in einem Becherglas gemischt. Nun wurde APS-Lösung (60 µl, 10 %) hinzugegeben und schnell vermischt. Die Lösung wurde zum Gießen von zwei *SDS*-Trenngelen verwendet. Anschließend wurden die Lösungen bis zur Verfestigung des Gels mit Butanol überschichtet. Nun wurde der Flüssigkeitsüberstand abdekantiert. In einem Becherglas wurde Acrylamid (570 µl, 30 %), Bisacrylamid (200 µl, 2 %), TRIS-Puffer (600 µl, pH 6,8), VE-Wasser (1,9 ml), *SDS*-Lösung (20 µl, 10 %) und TEMED (5 µl) vermischt. Anschließend wurde APS-Lösung (20 µl, 10 %) hinzugegeben. Mit dieser Lösung wurde das Sammelgel gegossen. Nach dem Verfestigen des Gels wurde es in eine *SDS-PAGE*-Gelkammer überführt, welche mit Elektrophoresepuffer befüllt war. Jede Geltasche wurde entweder mit 10-40 µl Proteinprobe oder 15 µl Proteinmarker befüllt. Die Proteinproben enthielten Proteinlösung (30 µl, max. 10 µg Protein), *SDS PAGE*-Probenpuffer (4 x, 10 µl) und DTT (50 mM). Das Gel wurde für 20 Min. unter Strom gesetzt (100 V, 400 mA). Anschließend wurde es entnommen, in *Coomassie SDS*-Färbelösung (200 ml) eingelegt und zum Sieden erhitzt. Nach ca. 20 Min. wurde die Lösung erneut zum Sieden erhitzt. Nach weiteren 20 Minuten wurde das Gel in VE-Wasser überführt, welches ebenfalls kurz zum Sieden erhitzt wurde. Anschließend erfolgte die Dokumentation des Gels.

#### AAV. 21 Herstellung von Aldehyddehydrogenase

Die Aldehyd-Dehydrogenase wurde - wie in der Literatur beschrieben- hergestellt<sup>[36]</sup> und mittels Nickel-Affinitätschromatographie (AAV. 19) aufgereinigt. Die Reinheit wurde mittels *SDS* -PAGE (AAV. 20) überprüft.

**AAV. 22 Genexpression und Aufreinigung mit exaktem pH-Wert**

Ein *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) wurde mit LB-Medium befüllt (1,6 ml), mit einem Loch im Deckel (ca. 3 mm) versehen und für 16-18 h mit den, das gewünschte Plasmid enthaltenden Bakterien aus einem Glycerolstock inokuliert (37 °C, 900 *rpm*). Anschließend wurde das Gefäß zentrifugiert (16000 g, 30 Sek.) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in IPTG-haltigem LB-Medium resuspendiert (1,6 ml) und für 6 h inkubiert (37 °C, 900 *rpm*). Nun wurde erneut zentrifugiert (16000 g, 30 Sek.). Die Zellen wurden in TEA-Puffer (2 mM, pH 8,2, 400 µl/Well) resuspendiert und zentrifugiert (16000 g für 3 Min.), der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Nun wurde in jedes Gefäß Lysepuffer (500 µl, Lysozym 42 kU, Benzonase 31 U, DTT 2 mM) gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Nach 4-stündiger Inkubation (30 °C, 900 *rpm*) und anschließender Erhitzung (70 °C, 20 Min.) wurde das Lysat nach Abkühlung auf RT erneut zentrifugiert (16000 g, 5 Min.). Der pH-Wert der Enzymlösung wurde auf 8,4 eingestellt.

---

### 5.5.2. Alkohol-Dehydrogenase-Assay

In einer Quarzküvette wurde in GlyGly-Puffer (50 mM, pH 7,5) Alkoholdehydrogenase (1,2 U) und NADH (165 nM) gelöst. Die Reaktion wurde bei 340 nm beobachtet. Nun wurde Propanal (100 mM) hinzugegeben und gemischt. Nach der Zugabe von Propanal fiel die Absorption sofort auf 0,25. Das Experiment wurde wiederholt, statt Propanal wurde Aceton verwendet. Es konnte keine Veränderung in der Absorption beobachtet werden.

Anschließend wurde eine Quarzküvette mit GlyGly-Puffer (50 mM, pH 7,5), Alkoholdehydrogenase (1,8 U), NADH-Lösung (165 nM) und FSA D6E<sup>[94]</sup> (570 µg) befüllt. Die Reaktion wurde bei 340 nm für 60 Sek. beobachtet. Danach wurde aus (5.7.3) hergestelltes 4-Hydroxyhexan-2-on (65 mM) hinzugegeben. Die Absorption stieg auf 4,0. Bei 10 mM (5.7.3) hergestelltes 4-Hydroxyhexan-2-on war derselbe Effekt zu beobachten. Nun wurde 4-Hydroxyhexan-2-on über Aktivkohle filtriert und das Experiment wiederholt. Es konnte kein Unterschied beobachtet werden. Ein NMR zeigte viele, schwache Signale im aromatischen Bereich.

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 6,00-6,10 (m); 6,40-6,50 (m); 6,75-6,95 (m)

Das Experiment wurde mit (5.7.9) hergestelltem 4-Hydroxyhexan-2-on (10 mM), FSA D6H und zusätzlich mit FSA K85M wiederholt. Ein Abfall der Absorption konnte bei beiden Proben beobachtet werden.

### 5.5.3. Sorbitol-Dehydrogenase-Assay

In eine Quarzküvette wurde TEA-Puffer (2 ml, 50 mM, pH 8,0) mit NAD<sup>+</sup> (165 µM) Sorbitol (150 mM) und Sorbitol-Dehydrogenase (0,5 U) vermischt. Die Absorptionsänderung wurde bei 340 nm gemessen; es fand eine Absorptionszunahme statt. Nun wurde das gleiche Experiment mit 4-Hydroxyhexan-2-on (12 mM) statt Sorbitol und NADH statt NAD<sup>+</sup> durchgeführt. Hier wurde keine Absorptionsänderung festgestellt.

### 5.5.4. Jod-Assay

Zwei Körnchen Jod (140 mg, 2,64 mM) wurden in TEA-Puffer (2 ml, 50 mM, pH 7,5) gelöst. Die nun orangefarbige Lösung wurde durch Zugabe von NADH (5 mg, 7,05 µmol) entfärbt. Anschließend wurde das Experiment wiederholt. Statt NADH wurde FSA (1 mg) hinzugegeben. Auch hier fand eine Entfärbung statt.

### 5.5.5. Vortests zum Resazurin-Assay

In eine 96-Well *flat bottom* Platte wurde Resazurinlösung (50 µl, ca. 300 µM Resazurin in TEA-Puffer 50 mM, pH 7,5 ) mit NADH-Lösung (50 µl) verschiedener Konzentrationen vermischt (Tabelle 20.).

**Tabelle 20.** Verfärbung von Resazurin durch verschiedene NADH-Konzentrationen

NADH [nM]	Zeit bis Farbveränderung [min]	Zeit bis vollständige Färbung
7000	10	2 h
700	10	-
70	Über Nacht	-
7	Über Nacht	-
-	-	-

Einer Probe wurde außerdem mit Diaphorase (0,75 U) versetzt, eine sofortige Farbänderung war zu beobachten. Als Kontrolle wurde einmalig statt NADH,  $\text{NAD}^+$  (14 mM) hinzugegeben. Nach 1 h war keine Färbung sichtbar. Nun wurde in einer 96-Well-Platte Resazurininlösung (100  $\mu\text{l}$ , ca. 300  $\mu\text{M}$  in Kaliumphosphat-Puffer 50 mM, pH 7,5) mit folgenden Zusätzen vermischt und die Zeit bis zur Farbänderung verfolgt (Tabelle 21.).

**Tabelle 21.** Verfärbung von Resazurin durch - aus Propanal-Oxidation entstandenes und mittels Diaphorase übertragenes - NADH

Aldehyddehydrogenase [ $\mu\text{l}$ ]	Diaphorase [U]	$\text{NAD}^+$ [mM]	Propanal [M]	Zeit bis zur Farbänderung [min]
10	1,50	7,0	-	10
1	0,15	0,7	-	30
10	1,50	7,0	1,1	~0,025
1	0,15	0,7	1,1	1
-	-	-	1,1	-
-	1,50	-	-	-

### 5.5.6. Resazurin-Assay

In einer 96-Well-Platte wurde Resazurininlösung (100  $\mu\text{l}$ , ca. 300  $\mu\text{M}$  in Kaliumphosphat-Puffer 50 mM, pH 7,5) mit folgenden Zusätzen vermischt und die Fluoreszenzemission bei 590 nm bei einer Anregung von 540 nm nach 30 Min. gemessen (Tabelle 22.).

**Tabelle 22.** Verfärbung von Resazurin durch Freisetzung von NADH aus gekoppelten enzymatischen Reaktionen

Aldehyddehydr ogenase [ $\mu\text{l}$ ]	Diaphorase [U]	FSA [ $\mu\text{g}$ ]	4-Hydroxyhexan-2-on [mM]	Emission nach 30 Min. bei 590 nm in <i>counts per minute</i>
-	0,15	570	12	4257
2	0,15	570	12	5026
-	0,15	285	12	845
2	0,15	285	12	1643
-	0,15	570	12	206
2	0,15	570	12	607

Als Kontrolle wurde 4-Hydroxyhexan-2-on (12 mM) in Resazurinlösung gegeben. Es konnte keine Färbung beobachtet werden. Das Lösen von FSA (1 mg) in Resazurinlösung führte zu einer starken Verfärbung.

### 5.5.7. Einfluss von DTT auf Resazurin

Ein Resazurinlösung (200  $\mu$ l, ca. 300  $\mu$ M) wurden mit verschiedene Mengen an DTT versetzt und die Emission wurde bei 590 nm bei einer Einstrahlung von 540 nm nach 5 Min. gemessen (Tabelle 23.).

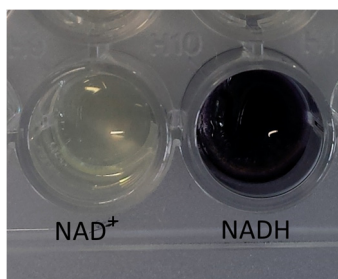
**Tabelle 23.** Verfärbung von Resazurin durch DTT

DTT [ $\mu$ M]	Emission bei 590 nm
100000	2514
10000	3576
1000	410
100	48
10	23
1	37
0	5



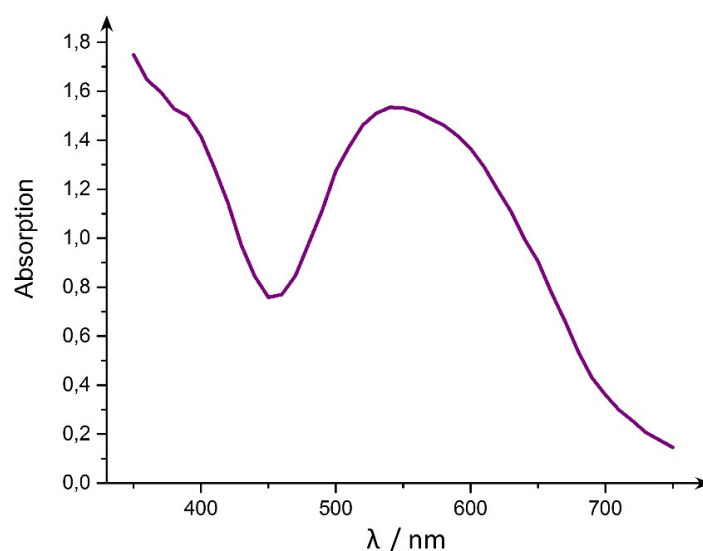
### 5.5.8. Nitroblautetrazoliumchlorid-Assay

In einer 96-Well *flat bottom* Platte wurde Nitroblautetrazoliumchlorid-Lösung (50  $\mu$ l, 0,5 mM in TEA-Puffer 50 mM, pH 7,5) mit Diaphorase (0,3 U) und entweder mit NADH-Lösung (0,5 mM, 50  $\mu$ l) oder mit NAD<sup>+</sup>-Lösung (0,5 mM, 50  $\mu$ l) versetzt. Bei NADH-Zugabe erfolgte sofort eine tiefe Violettfärbung, die Lösung mit NAD<sup>+</sup> blieb farblos (Abb. 116.). Ohne Zugabe von Diaphorase blieben beide Proben länger als 10 Min. farblos.



**Abb. 116.** NBT mit NAD<sup>+</sup> (0,25 mM) und NADH (0,25 mM) in einer 96-Well-Platte

Von der reduzierten NBT-Lösung (0,5 mM) wurde ein Absorptionsspektrum gemessen (400-700 nm, Abb. 117.).



**Abb. 117.** Absorptionsspektrum von reduziertem NBT

In eine 96-Well *flat bottom* Platte wurde NBT (50  $\mu$ l 0,5 mM) mit NAD<sup>+</sup>-Lösung (0,5 mM, 50  $\mu$ l, Diaphorase (0,3 U), Aldehyddehydrogenase (2  $\mu$ l) und verschiedenen Substraten versetzt (Tabelle 24.).

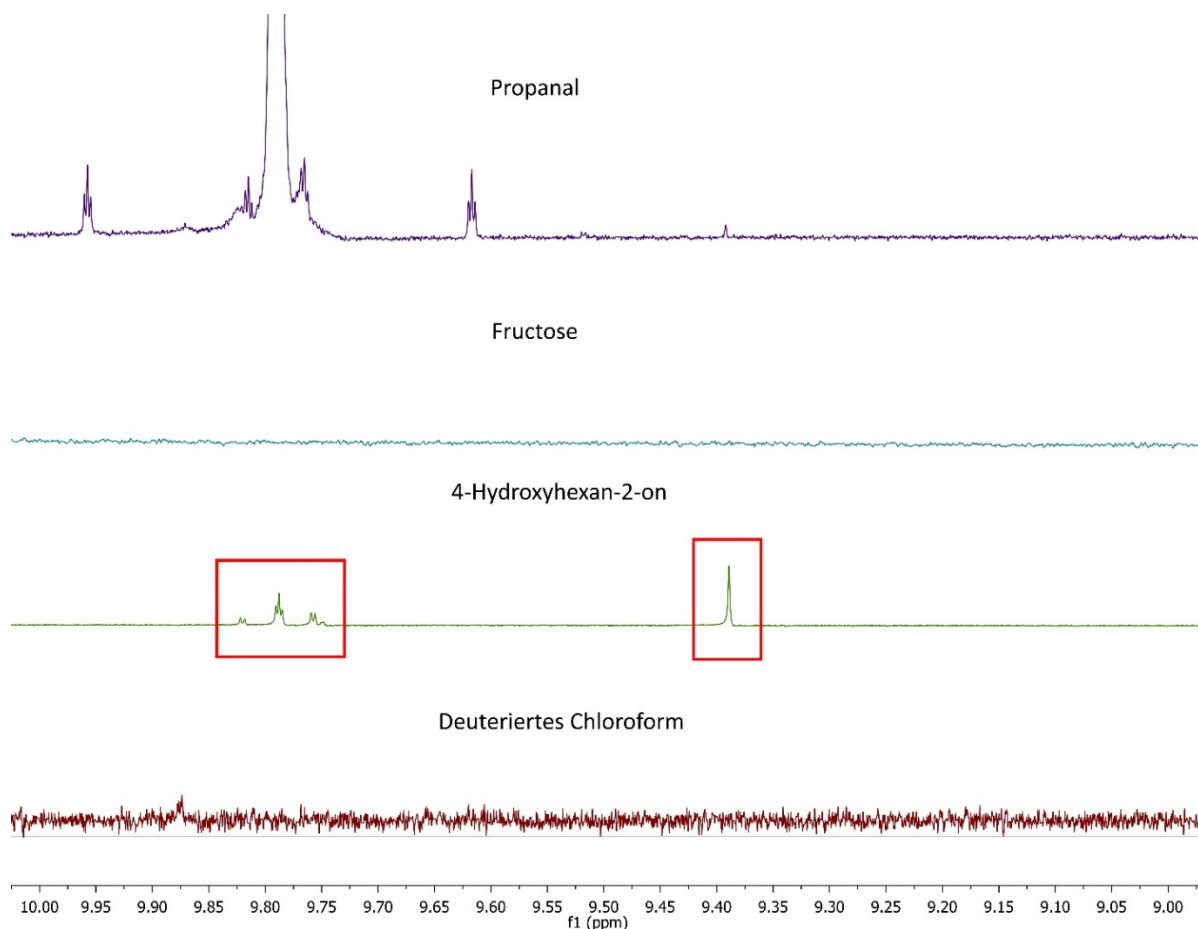
**Tabelle 24.** Verfärbung von NBT durch verschiedene Substanzen

Substrat	Verfärbung von NBT
4-Hydroxyhexan-2-on (100 mM, aus 5.7.9)	Ja
Aceton (700 mM)	Nein
<i>Sec-Butanol</i> (700 mM)	Nein
Fructose (700 mM)	Nein

Auch hier führt DTT zu einer Färbung von NBT. Bei einer Gesamtkonzentration von unter 100 nM war diese jedoch nicht vollständig.

### 5.5.9. Eliminierung von Aldehydspuren in 4-Hydroxyhexan-2-on

4-Hydroxyhexan-2-one (50 µg) aus (5.7.9), Propanal (50 µg) und das NMR-Lösungsmittel ( $\text{CDCl}_3$ ) wurde per NMR analysiert. Die Anzahl der Scans wurde auf 64 erhöht. Zusätzlich wurde Fructose (50 µg) in  $\text{D}_2\text{O}$  vermessen. Der Bereich von 9,0 – 10,0 ppm wurde stark vergrößert verglichen (Abb. 118.).



**Abb. 118.** NMR-Nachweis von Aldehydspuren in verschiedenen Substanzen

Der Anteil an Aldehyden beträgt ungefähr 3 % (durch Integration bestimmt).

### Quenchen von Aldehydspuren mit *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid

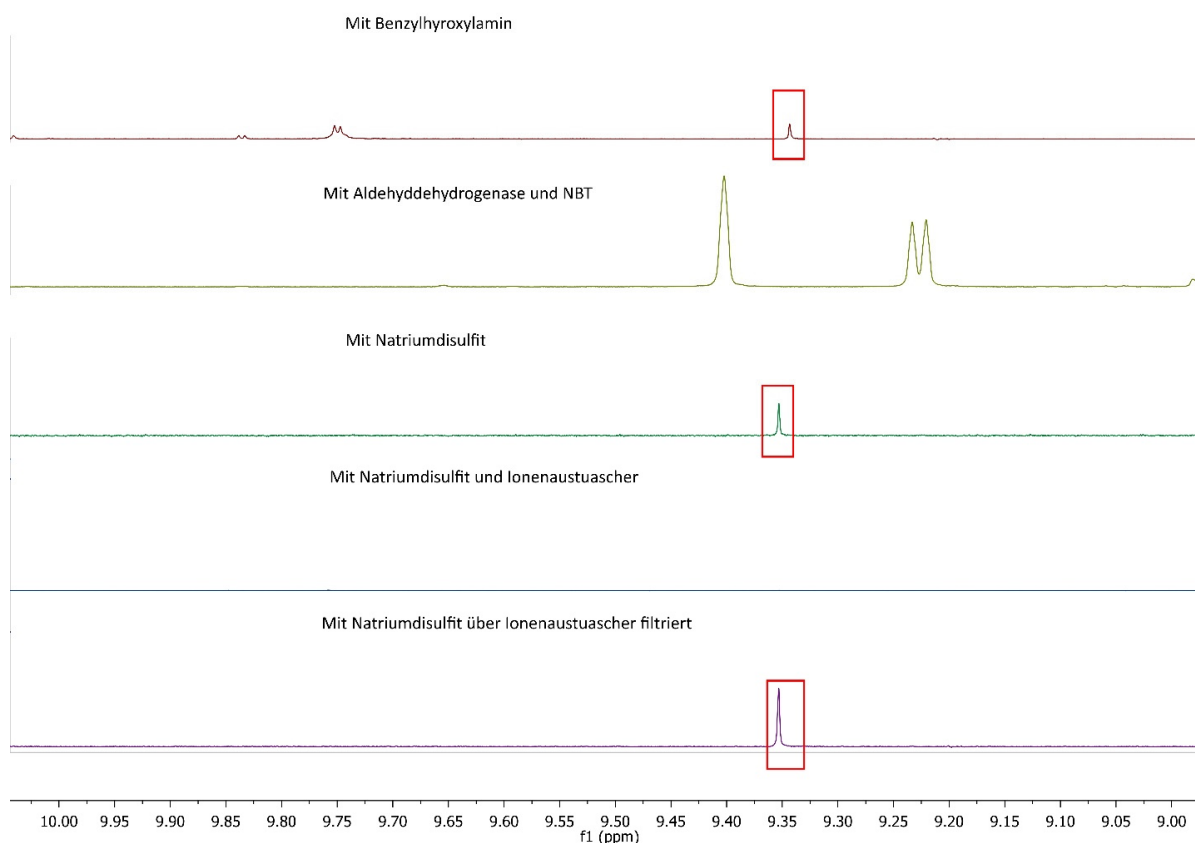
Nun wurde 4-Hydroxyhexan-2-on in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst (370 mM, aus 5.7.9), mit *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid (48 mM) versetzt und für 1 h inkubiert (37 °C). Es erfolgte eine Extraktion mit Cyclohexan (1 x 300 µl). Die  $\text{D}_2\text{O}$ -Phase wurde per NMR analysiert. Es waren noch Aldehydspuren vorhanden (Abb. 119.).

### Quenchen von Aldehydspuren mit Aldehyd-Dehydrogenase

Zu mit -  $\text{D}_2\text{O}$  hergestelltem - TEA-Puffer (100 mM, pH 9,0) wurde  $\text{NAD}^+$  (28 mM), 4-Hydroxyhexan-2-on (10 mM, aus 5.7.9), NBT (0,7 mM), Aldehyd-Dehydrogenase-Lösung (100 µl) und Diaphorase (5 U) gegeben. Nach 1 h wurde die Reaktion per NMR analysiert (Abb. 119.). Die aromatischen NBT-Signale sind zu sehen, die Aldehydsignale sind verschwunden.

### Quenchen von Aldehydspuren mit Natriumdisulfit

In D<sub>2</sub>O wurde 4-Hydroxyhexan-3-on (5.7.9, 12 mM) mit Natriumdisulfit (5,2 mM) versetzt. Nach 1 h wurde das Reaktionsgemisch per NMR analysiert (Abb. 119.). Das Experiment wurde wiederholt. Das Reaktionsgemisch wurde vor der NMR-Analyse mit basischem Ionenaustauscher gerührt. Die Aldehydsignale sind verschwunden, jedoch auch ca. 50 % der Gesamtsubstanzsignals. Eine Wiederholung, bei der das Gemisch über basischem Ionenaustauscher gefiltert wurde, zeigte keine Abnahme der Substratsignale.

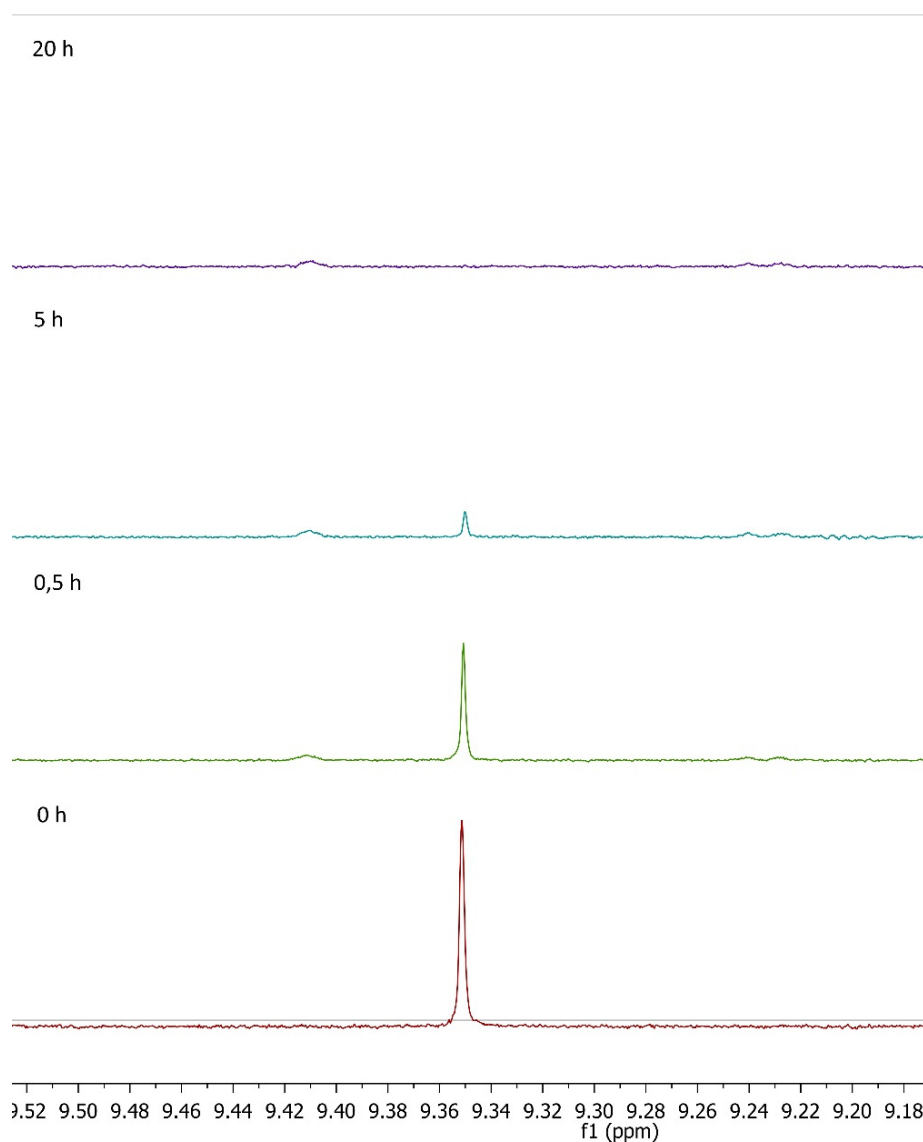


**Abb. 119.** Nachweis von Aldehydspuren nach verschiedenen Methoden zur Beseitigung derselben

Zur praktischen Umsetzung wurde nun folgendes Assaysystem verwendet.

### 5.5.10. Kombiniertes Resazurinassay

In einem Reaktionsgefäß wurden 4-Hydroxyhexan-2-on (27 mM, aus 5.7.9) in - mit D<sub>2</sub>O angesetzten - Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 8,5) gelöst. Die trübe Lösung wurde in *Eppendorf*-Gefäßen zentrifugiert (5 Min. 16000 g) und per NMR analysiert. Der Großteil der nun klaren Lösung (90 %) wurde mithilfe von *Eppendorf*-Pipetten in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Pyruvat (3,6 mM) versetzt. Nun wurde der pH-Wert erneut auf 8,5 eingestellt. Anschließend wurde Lactat-Dehydrogenase (27,5 U) und Aldehyd-Dehydrogenase (10 µl) sowie DTT (0,05 mM) hinzugegeben. Es wurde erneut ein NMR angefertigt. Nach 30 Min., 5 h und nach 20 h bei RT wurde ein Teil der Lösung mittels *VIVASPIN 500* (MWCO 10000) filtriert, um die Proteine zu entfernen und den Durchfluss per NMR zu analysieren (Abb. 120.).



**Abb. 120** Abnahme der Aldehydsignale durch das Aldehyddehydrogenase/Lactatdehydrogenase-Pyruvat-System.

Der obige Versuch wurde in nicht deuteriertem Puffer mit verschiedenen Pyruvatkonzentrationen wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde erneut Aldehyd-Dehydrogenase (10  $\mu$ l), Resazurinlösung (100  $\mu$ l, 300  $\mu$ M) und Diaphoraselösung (24 U) hinzugegeben. Die Geschwindigkeit der Violettfärbung nahm ab, war aber vorhanden (Tabelle 25.).

**Tabelle 25.** Verfärbung von Resazurin-Assaylösung nach Quenching von Aldehydspuren mit verschiedenen Pyruvatmengen

Pyruvat in mM	Violettfärbung [min]
30	1
9	2
4,5	5
1,8	5

### 5.5.11. Phenolrot-Assay

Eine Assaylösung wurde aus TEA-Puffer (870  $\mu$ l, 2 mM pH 7,5), Phenolrotlösung (18  $\mu$ l, 1 mg/ml in 20 % EtOH) und Aldehyd-Dehydrogenase-Lösung (4  $\mu$ l) hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 8,2 eingestellt. Eine Substratlösung wurde aus TEA-Puffer (2 mM, pH 7,5)  $\text{NAD}^+$  (5,8 mM) und Butanal (111 mM) hergestellt. Der pH-Wert wurde ebenfalls auf 8,2 eingestellt. Nun wurde Assaylösung und Substratlösung zu gleichen Teilen miteinander vermischt (je 50  $\mu$ l). Nach 30 Min. hat sich die Lösung von pink zu gelb gefärbt.

Von Phenolrot wurde bei verschiedenen pH-Werten ein Absorptionsspektrum gemessen (400-700 nm, Abb. 121.).

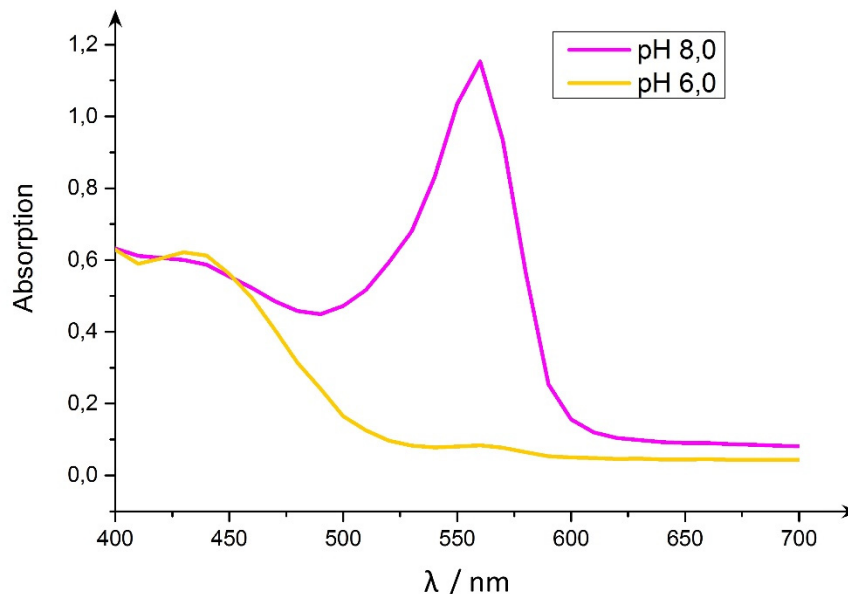
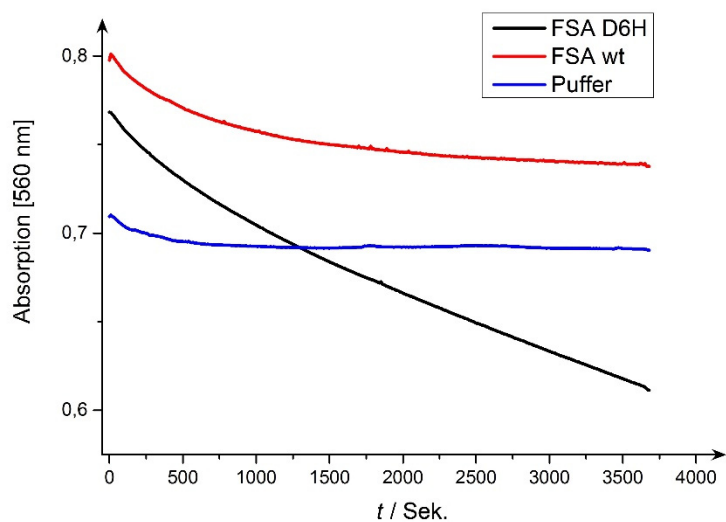


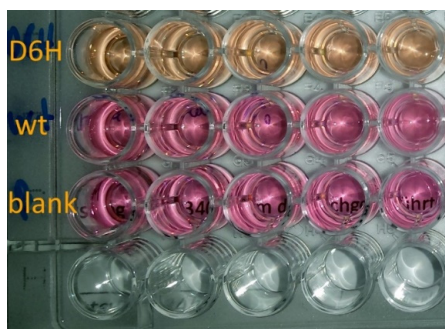
Abb. 121. Absorptionsspektrum von Phenolrot bei pH 8,0 und 6,0

Nun wurde eine schwach gepufferte Enzymlösung von FSA D6H und FSA wt nach AAV. 22 hergestellt (pH 8,3). Anschließend wurde eine Substratlösung aus TEA-Puffer (2 mM, pH 8,3) und 4-Hydroxyhexan-2-on (27 mM aus 5.7.9) hergestellt. Diese wurde in *Eppendorf*-Gefäßen (2 ml) zentrifugiert (16000 g, 3 Min.). Die Lösung wurde in ein neues Gefäß überführt und mit  $\text{NAD}^+$  (3,6 mM) und Phenolrot (150  $\mu$ l, 1 mg/ml in 20 % EtOH) versetzt. Der pH-Wert wurde auf 8,2 eingestellt. Anschließend wurde Aldehyd-Dehydrogenase (70  $\mu$ l) und DTT (2 mM) hinzugegeben. Der fallende pH-Wert wurde 2 h lang immer wieder auf pH 8,3 eingestellt. Anschließend wurden beide Lösungen erneut zentrifugiert (16000 *rpm*, 10 Min.). Nun wurde in jedes Well einer Reihe einer 96-Well *flat bottom* Platte Analyselösung (150  $\mu$ l) gegeben. Danach wurde in Reihe E FSA-D6H-Enzymlösung (50  $\mu$ l), in Reihe F FSA-wt-Enzymlösung (50  $\mu$ l) und in Reihe G TEA-Puffer (2 mM, pH 8,2, 50  $\mu$ l) hinzugefügt. Der Reaktionsverlauf wurde bei 560 nm beobachtet (Abb. 122.).



**Abb. 122.** Phenolrotassay von FSA D6H vs FSA bei 560 nm aufgenommen.

Nach 24 h wurde folgendes Bild aufgenommen (Abb. 123.):



**Abb. 123.** Phenolrotassay von FSA D6H vs FSA.

### 5.5.12. Borsäureazofarbstoff-Assay

*N*-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-[3-methyl-4-(4-nitrophenylazo)-phenyl]amin wurde - wie in der Literatur beschrieben - hergestellt<sup>[114]</sup>. In einem Reaktionsgefäß wurde in MeOH (5 ml) und TEA-Puffer (5 ml, 50 mM, pH 11,4) *N*-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-[3-methyl-4-(4-nitrophenylazo)-phenyl]amin (230 µM) gelöst. Die Flüssigkeit wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt, in eines wurde Fructose (250 mM) gegeben. Es erfolgte ein Farbumschlag von Violett zu Orange.

Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, statt Fructose wurde (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanal oder (2*R*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanol, Hydroxyaceton oder Dihydroxyaceton verwendet. Jedes Mal erfolgte eine Farbänderung (Abb. 124.).

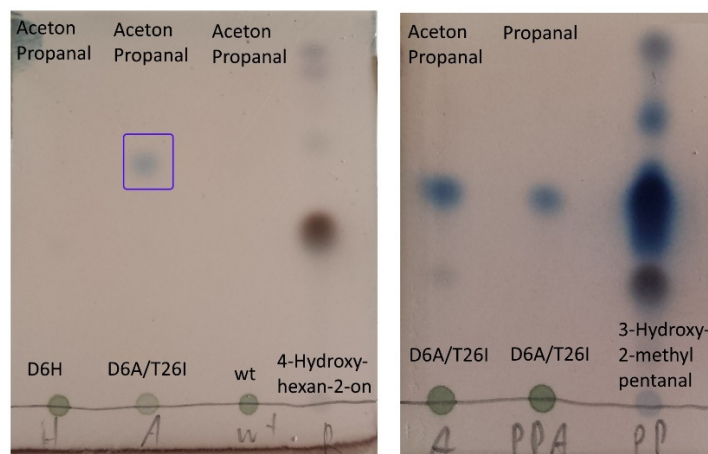


**Abb. 124.** Im rechten Gefäß ist basische *N*-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-[3-methyl-4-(4-nitrophenylazo)-phenyl]amin-Lösung. Das linke Gefäß steht stellvertretend für basische *N*-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-[3-methyl-4-(4-nitrophenylazo)-phenyl]amin-Lösung, welcher verschieden Diole, Hydroxyketone oder Hydroxyaldehyde hinzugefügt wurde.



### 5.5.13. Dünnschichtchromatographisches-Screening der 3DM-Mutante D6A/T26I

In je einem Reaktionsgefäß wurde FSA D6A/T26I (170 mg), FSA wt (170 mg) sowie FSA D6H (170 mg) in TEA-Puffer (60 ml, 50 mM) mit DTT (2 mM) gelöst und mit Propanal (116 mM) und Aceton (1,05 M) versetzt. Nach 1,5 h wurden die Reaktionen dünnschichtchromatographisch analysiert und mit 4-Hydroxyhexan-2-on (aus 5.7.9) verglichen (Abb. 120.). Der Versuch wurde wiederholt, jedoch nur mit FSA D6A/T26I und ohne Aceton. Es bildet sich der gleiche Produktpot (Abb. 125.). Das FSA D6A/T26I Produkt wurde nun mit dem 3-Hydroxy-2-methylpropanal Produkt der DERA verglichen<sup>[118]</sup>.



**Abb. 125** Dünnschichtchromatographische Analyse von FSA-wt, D6H, D6A/T26I mit Aceton und Propanal oder nur mit Propanal als Substrat. Als Vergleichssubstanz wurde links 4-Hydroxyhexan-2-on und rechts 3-Hydroxy-2-methylpentanal verwendet. Die Analyse fand links nach 1,5 h Reaktionszeit und rechts nach 36 h statt. Laufmittel Cy: EtOAc 1:1, Färbemittel Anisaldehyd

## 5.6. Screening von FSA-Bibliotheken

### 5.6.1. Allgemeine Arbeitsanweisungen

Jedes *Well* enthält ca. 9 µg FSA.

#### AAV. 23 Dünnschichtchromatographisches Screening von 96-Well-Platten

Eine 96-Well-Masterplatte wurde angetaut und die Folie entfernt. Ein steriler 96-Well-Metallstempel (Abb. 104.) wurde für eine Minute hineingestellt. Mit diesem wurde eine 96-Well-Deep-Well-Platte mit U-Boden (2,2 ml), welche LB-Medium enthält (950 µl/Well), für ca. 30 Sek. inokuliert. Anschließend wurde die 96-Well-Platte mit Acetatfolie verschlossen; über jedem Well wurde ein Loch in die Folie gestoßen (2 mm). Die Platte wurde für 18 h inkubiert (30 °C, 230 *rpm*) und anschließend bei 4 °C gelagert (ca. 6 h). Nun wurde sie zentrifugiert (2254 g, 30 Min.). Der Überstand wurde verworfen und in jedes Well wurde IPTG-haltiges LB-Medium (950 µl) pipettiert. Die Platte wurde mit einer Acetatfolie verschlossen und die Zellpellets resuspendiert (2500 *rpm*). Anschließend wurde über jedem Well erneut ein Loch in die Folie gestanzt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 18 h (30 °C, 230 *rpm*). Die Platte wurde zentrifugiert (2254 g, 30 Min.) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit TEA-Puffer (500 µl/Well, 50 mM, pH 8,0), Aceton (ca. 1229 mM) und frisch destilliertem Propanal (75,6 mM) versetzt. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Acetatfolie verschlossen und die Zellpellets resuspendiert (2500 *rpm*). Die Platte wurde für 6-18 h inkubiert (37 °C, 1200 *rpm*). Aus jedem Well wurde eine Probe entnommen (2,3 µl) und dünnschichtchromatographisch analysiert (Laufmittel EtOAc/Cy 1:1, Anisaldehydfärbung).

---

## AAV. 24 Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening von 96-Well-Platten 1

Eine 96-Well-Masterplatte wurde angetaut und die Folie entfernt. Ein steriler 96-Well-Metallstempel (Abb. 104.) wurde für eine Minute hineingestellt. Mit diesem wurde eine 96-Well-Deep-Well Platte mit U-Boden (2,2 ml), welche LB-Medium enthält (950 µl/Well), für ca. 30 Sek. inokuliert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Acetatfolie verschlossen; über jedem Well wurde ein Loch in die Folie gestoßen (2 mm). Die Platte wurde für 18 h inkubiert (30 °C, 230 rpm) und anschließend bei 4 °C gelagert (ca. 6 h). Nun wurde sie zentrifugiert (2254 g, 30 Min.). Der Überstand wurde verworfen und in jedes Well wurde IPTG-haltiges LB-Medium (950 µl) pipettiert. Die Platte wurde mit einer Acetatfolie verschlossen und die Zellpellets resuspendiert (2500 rpm). Anschließend wurde über jedem Well erneut ein Loch in die Folie gestanzt. Es erfolgt eine erneute Inkubation für 18 h (30 °C, 230 rpm). Die Platte wurde zentrifugiert (2254 g für 30 Min.) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit TEA-Puffer (500 µl/Well, 50 mM, pH 8,0), Aceton (ca. 1229 mM) und frisch destilliertem Propanal (75,6 mM) versetzt. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Acetatfolie verschlossen und die Zellpellets resuspendiert (2500 rpm). Die Platte wurde für 2-24 h inkubiert (37 °C, 1200 rpm) und anschließend zentrifugiert (30 Min., 2254 g). Pro Well wurden 50 µl entnommen und in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit U-Boden überführt. In jedes dieser Wells wurde MeOH (50 µl) hinzugegeben. Die Platte wurde mit Acetatfolie verschlossen und bei RT inkubiert (20 Sek. 1200 rpm). Anschließend wurde die Platte zentrifugiert (2254 g, 30 Min.) und aus jedem Well eine Probe auf eine DC-Platte aufgetragen (4 µl/Well, 6 mm Bandenbreite CAMAG-Autosampler). Die Platte wurde mit einer Heizpistole vorsichtig getrocknet und in einer DC-Kammer entwickelt (Laufmittel: EtOAc/Cy, 1:1). Die entwickelte DC-Platte wurde mit Anisaldehyd-Lösung im Trockenofen angefärbt (110 °C, ca. 90 Sek.) und densitometrisch analysiert.

### AAV. 25 Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening aus 96-Well-Platten 2

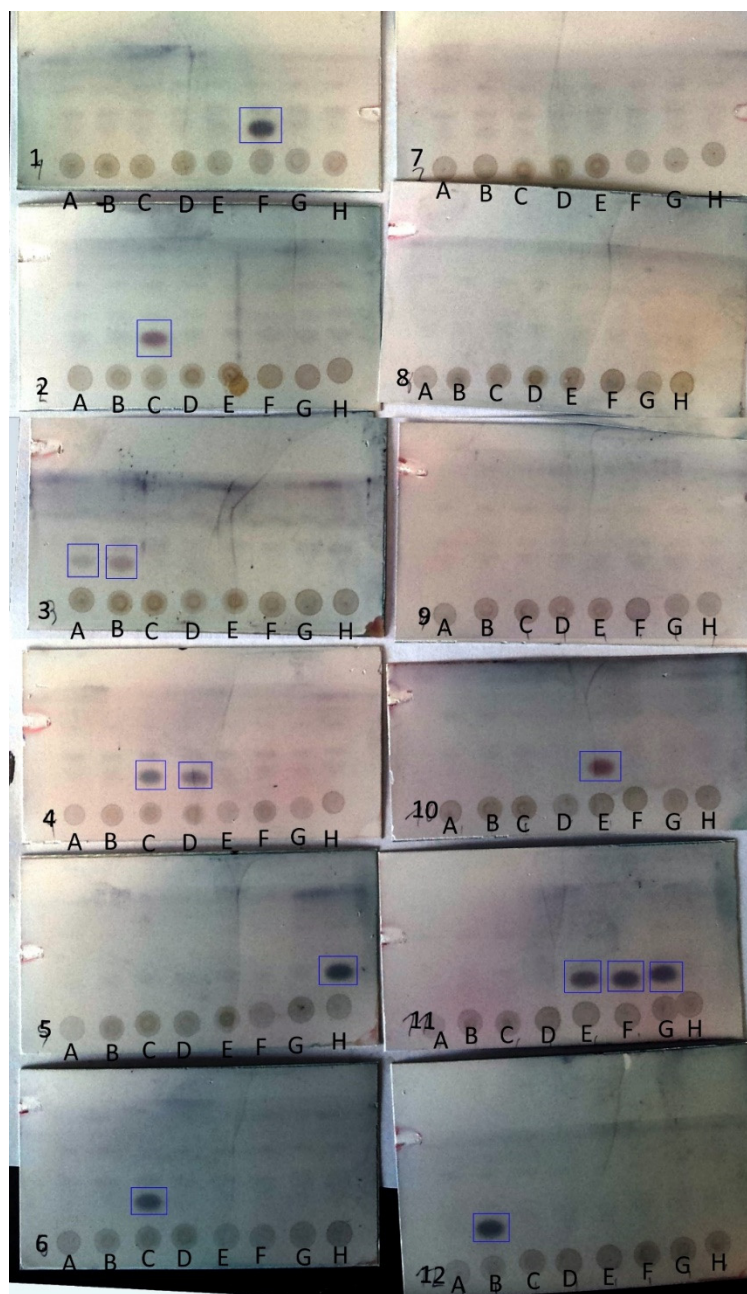
Eine 96-Well-Masterplatte wurde angetaut und die Folie entfernt. Ein steriler 96-Well-Metallstempel (Abb. 104.) wurde für eine Minute hineingestellt. Mit diesem wurde eine 96-Well-Deep-Well Platte mit U-Boden (2,2 ml), welche LB-Medium enthält (950 µl/Well), für ca. 30 Sek. inokuliert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Acetatfolie verschlossen, über jedem Well wurde ein Loch in die Folie gestoßen (2 mm). Die Platte wurde für 18 h inkubiert (30 °C, 230 rpm) und anschließend bei 4 °C gelagert (ca. 6 h). Nun wurde sie zentrifugiert (2254 g, 30 Min.). Der Überstand wurde verworfen und in jedes Well wurde IPTG-haltiges LB-Medium (950 µl) pipettiert. Die Platte wurde mit einer Acetatfolie verschlossen und die Zellpellets resuspendiert (2500 rpm). Anschließend wurde über jedem Well erneut ein Loch in die Folie gestanzt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 18 h (30 °C, 230 rpm). Die Platte wurde zentrifugiert (2254 g, 30 Min.) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Lysepuffer (1ml/Well, Lysozym 85 kU, Benzonase 62 U, DTT 2 mM) resuspendiert, für 4 h inkubiert (30 °C, 900 rpm) und erhitzt (65 °C, 30 Min.). Nach dem Abkühlen wurde sie zentrifugiert (2254 g, 30 Min.). Ein Teil des Lysats (400 µl) von jedem Well wurde in eine neue 96-Well-Deep-Well-Platten überführt und dort mit TEA Puffer (500 µl, 50 mM, pH 8,3) gemischt. Nun wurden die Substrate hinzugegeben. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Acetatfolie verschlossen und für 2-24 h inkubiert (37 °C, 1200 rpm). Nach anschließender Zentrifugation (2254 g, 30 Min.) wurden von jedem Well etwas (50 µl) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit U-Boden überführt. In jedes dieser Wells wurde MeOH (50 µl) hinzugegeben. Die Platte wurde mit Acetatfolie verschlossen und bei RT inkubiert (1200 rpm, 20 Sek.). Nun wurde die Platte zentrifugiert (2254 g, 30 Min.) und aus jedem Well eine Probe auf eine DC-Platte aufgetragen (4 µl/Well, 6 mm Bandenbreite CAMAG-Autosampler). Die Platte wurde mit einer Heizpistole vorsichtig getrocknet und in einer DC-Kammer entwickelt (Laufmittel war EtOAc/ Cy im Verhältnis 1:1). Die entwickelte DC-Platte wurde mit Anisaldehyd-Lösung im Trockenofen angefärbt (110 °C, ca. 90 Sek.) und densitometrisch analysiert.

### AAV. 26 Genexpression in Eppendorf-Gefäßen

Ein Eppendorf-Gefäß (2 ml) wurde mit LB-Medium befüllt (1,6 ml), mit einem Loch im Deckel (ca. 3 mm) versehen und für 16-18 h mit den - das gewünschte Plasmid enthaltenden - Bakterien aus einem Glycerolstock inokuliert (37 °C, 900 rpm). Anschließend wurde das Gefäß zentrifugiert (16000 g, 30 Sek.) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in IPTG-haltigem LB-Medium resuspendiert (1,6 ml) und für 6 h inkubiert (37 °C, 900 rpm). Nun wurde erneut zentrifugiert (16000 g, 30 Sek.) und die Zellen in Lyse-Puffer (500 µl, Lysozym 42000 U, Benzonase 31 U, DTT 2 mM) resuspendiert (2500 rpm). Nach 4 stündiger Inkubation (30 °C, 900 rpm) und anschließender Erhitzung (65 °C, 30 Min.) wurde das Lysat nach Abkühlung auf RT zentrifugiert (16000 g).

### 5.6.2. Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA D6L/N28X-Bibliothek

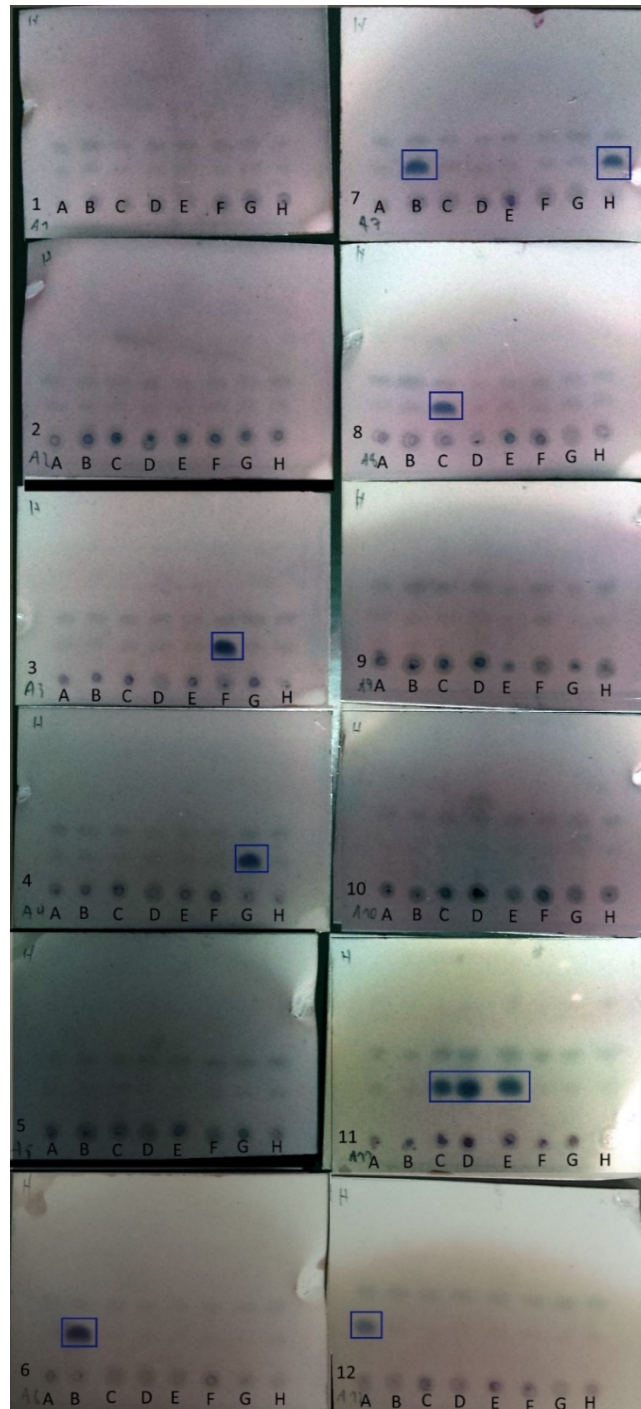
Die in 5.4.8 erstellte Bibliothek D6L/N28X wurde mittels dünnschichtchromatographischem Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 126.). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast und Helligkeit durch die automatische Funktion des Programmes paint.net<sup>[150]</sup> optimiert.



**Abb. 126.** Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA-Mutanten-Bibliothek D6L/N28X mit Aceton und Propanal nach 5 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde EtOAc./Cy,1:1, zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Alle als positiv gewerteten Mutanten wurden mit einem blauen Rechteck markiert. A3 enthält lediglich ca. 10 % D6L/ N28N und B3 ca. 30 % D6L/N28N.

### 5.6.3. Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA D6H/N28X-Bibliothek

Die in 5.4.10 erstellte Bibliothek D6H/N28X wurde mittels dünnschichtchromatographischem Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 127.). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast und Helligkeit durch die automatische Funktion des Programmes paint.net<sup>[150]</sup> optimiert.

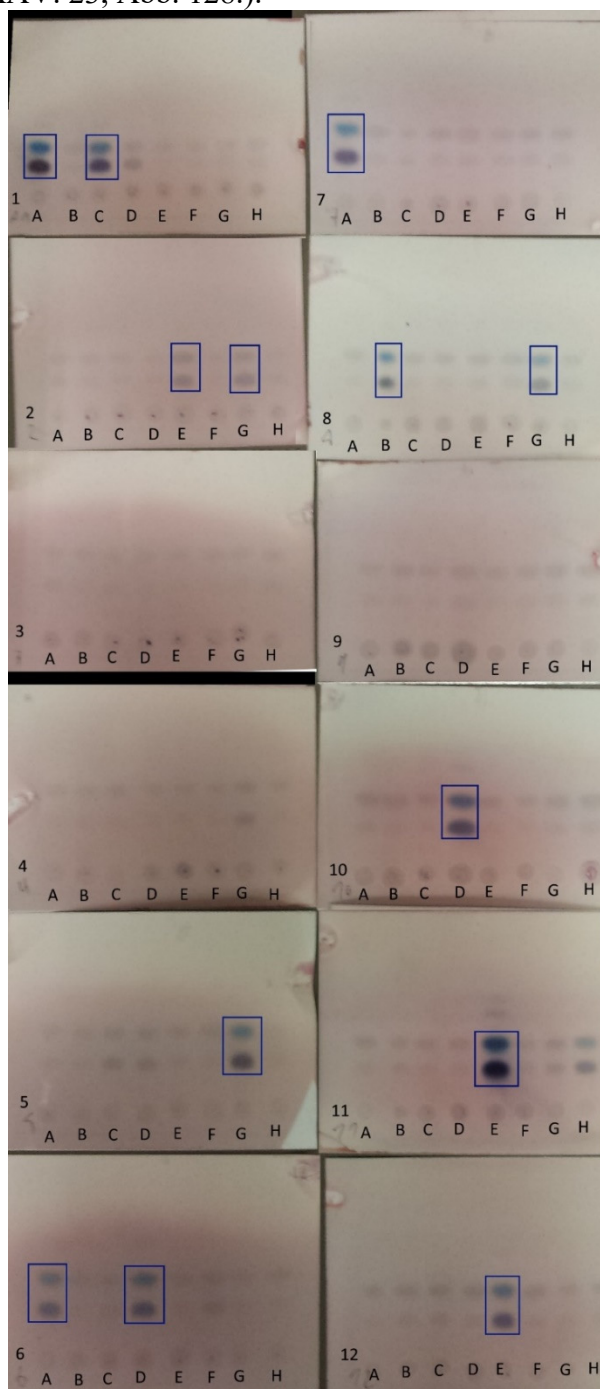


**Abb. 127.** Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA-Mutanten-Bibliothek D6H/N28X mit Aceton und Propanal nach 5 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde EtOAc./Cy,1:1, zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Alle als positiv gewerteten Mutanten wurden mit einem blauen Rechteck markiert. A12 enthält nur ca. 60 % D6H/N28N



#### 5.6.4. Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA D6E/N28X-Bibliothek

Die in 5.4.9 erstellte Bibliothek D6E/N28X wurde mittels dünnschichtchromatographischem Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 128.).

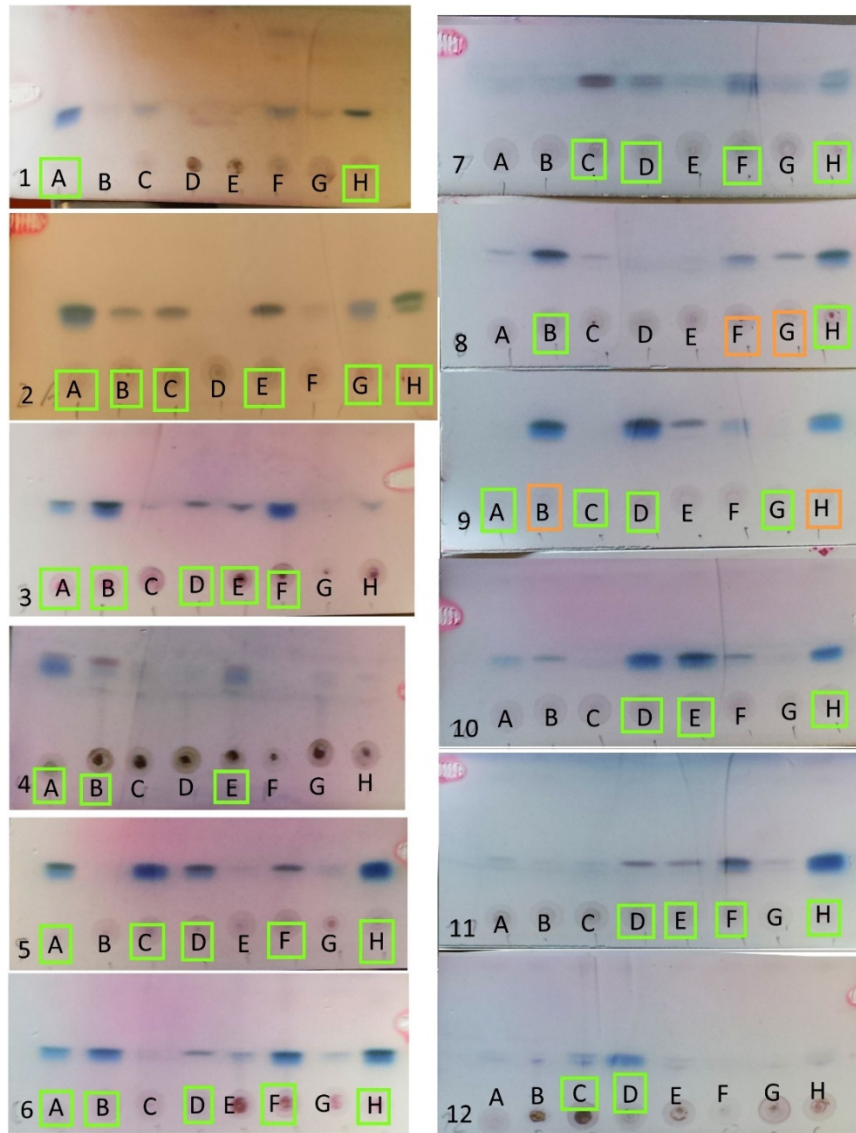


**Abb. 128.** Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA-Mutanten-Bibliothek D6E/N28X mit Aceton und Propanal nach 5 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde EtOAc./Cy,1:1, zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Alle als positiv gewerteten Mutanten wurden mit einem blauen Rechteck markiert. B8 enthält ca. 80 % D6E/N28N. Alle aktiven Treffer sind D6H/N28N.

Von den positiven Treffern dieser drei Screenings wurden durch Verwendung der Masterplatten die Plasmide isoliert (AAV. 11) und sequenziert (AAV. 15). Alle aktiven Treffer sind D6E/N28N bzw. D6H/N28N bzw. D6L/N28N. Schwach ausgeprägte Spots enthielten noch verschiedene andere, anscheinend inaktive Varianten.

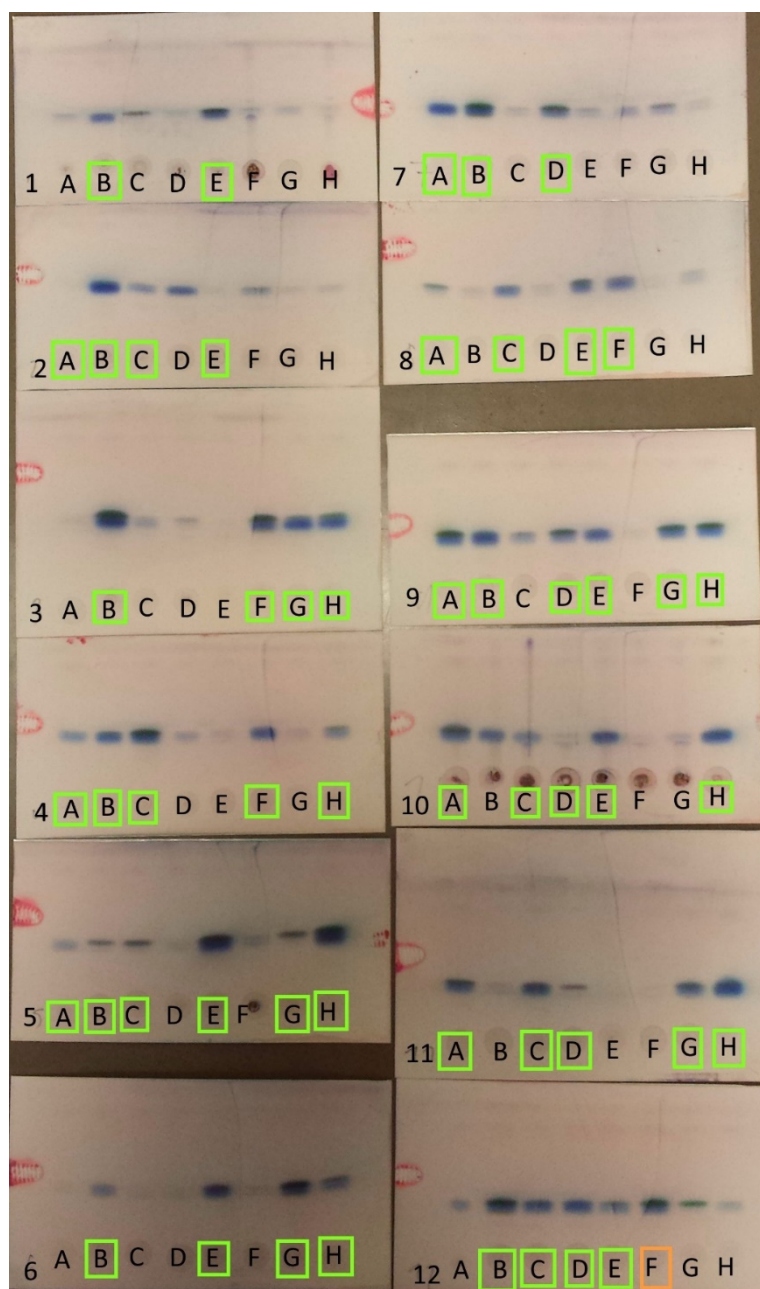
### 5.6.5. Dünnschichtchromatographisches Screening und Rescreening der FSA D6X/T26X Bibliothek mit Aceton und Propanal

Die in 5.4.11 erstellte Bibliothek wurde mittels dünnschichtchromatographischem Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 129., Abb. 130.). Zur besseren Darstellung wurde die Farbsättigung angepasst.



**Abb. 129.** Dünnschichtchromatographisches Screening der ersten 96-Well-Platte der FSA-Bibliothek D6X/T26X mit Aceton und Propanal als Substrat nach 6 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 15:1 zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Alle für das Rescreening ausgewählten Mutanten wurden mit einem grünen Rechteck markiert. Orange markierte wurden nicht verwendet, aber sequenziert.





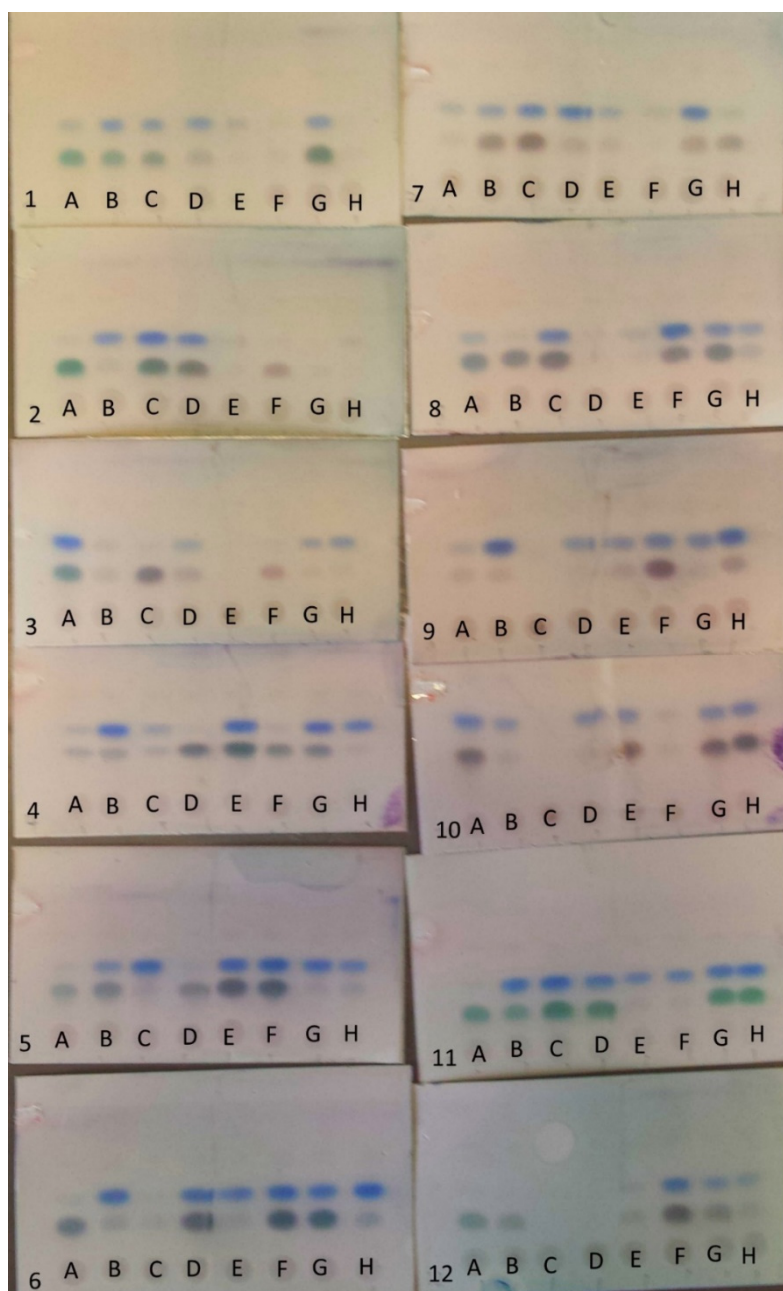
**Abb. 130.** Dünnschichtchromatographisches Screening der zweiten 96-Well-Platte der FSA-Bibliothek D6X/T26X mit Aceton und Propanal als Substrat nach 6 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde DCM/MeOH, 15:1 zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Alle für das Rescreening ausgewählten Mutanten wurden mit einem grünen Rechteck markiert. Orange markierte Mutanten wurden nicht verwendet, aber sequenziert.

Es wurde nun eine *Rescreening*-Bibliothek erstellt (AAV. 14, Tabelle 26), welche mit den Bakterienstocks aus folgenden *Wells* der Masterplatten der FSA-Bibliothek D6X/T26X inokuliert wurden (die grün markierten Varianten auf den DC-Platten. Abb. 129. und Abb. 130.).

**Tabelle 26.** Positionen der Masterplatten D6X/T26X, welche für das Erstellen einer *Rescreening-Library* ausgewählt wurden. Links befindet sich Masterplatte 1, rechts Masterplatte 2.

Reihe	Spalte	Reihe	Spalte
1	A, H	1	B, E
2	A, E, G, H	2	A, E
3	A, E, F	3	B, F, G, H
4	A, E	4	A, C, F, H
5	A, D, F, H	5	A, E, G, H
6	A, D, F, H	6	B, E, G, H
7	C, D, F, H	7	A, D
8	B, H	8	A, E, F
9	A, D, G	9	A, E, G, H
10	D, E, H	10	A, E, H
11	D, E, F, H	11	A, D, G, H
12	C, D	12	B, E

Die so erstellte *Rescreening-Library* wurde mittels dünnschichtchromatographischem Screening (AAV. 23, Abb. 131.) analysiert, zur besseren Darstellung wurde die Farbsättigung angepasst.



**Abb. 131.** Dünnschichtchromatographisches *Screening* der *Rescreening-Library* mit Aceton und Propanal als Substrat nach 6 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet.

### 5.6.6. Sequenzierung der *Rescreening-Library* und Erstellung einer *Hit-Library*

Von jedem Klon der *Rescreening-Library* wurde Plasmid isoliert (AAV. 11) und sequenziert (AAV. 15, Tabelle 27.).

**Tabelle 27.** Sequenzierungsergebnisse der *Rescreening-Library*. Grün markierte Varianten erzeugen hauptsächlich den grünen DC-Spot ((*R*)-4-Hydroxyhexan-2-on), blau markierte den blauen ((2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpropanal) und rot markierte sind inaktiv.

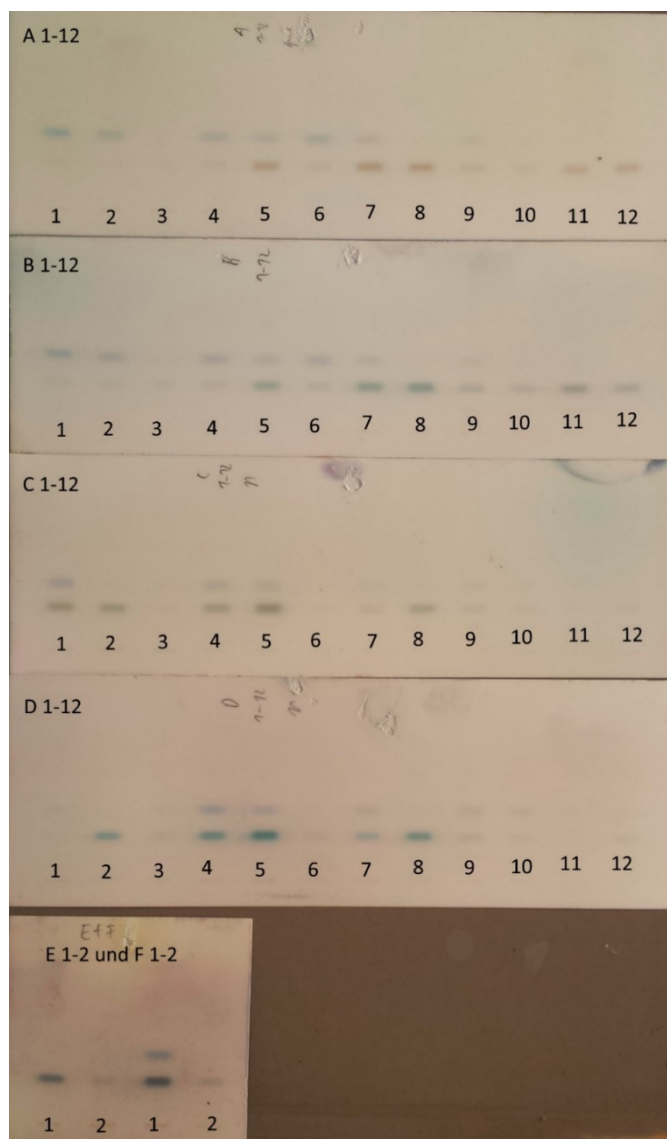
Position	Mutation D6X/T26X		Position	Mutation D6X/T26X		Position	Mutation D6X/T26X	
A01	D6E	T26A	C09	D6V	T26V*	F05	D6E	T26A
A02	D6H	wt	C10	D6P	wt	F06	D6A	T26A
A03	Plasmid	Mix	C11	D6E	T26A	F07	D6E	T26V
A04	D6L	T26V	C12	D6E	T26A	F08	D6H	T26A
A05	D6L	wt	D01	D6A	T26V	F09	D6A	wt
A06	D6H	wt	D02	D6A	T26A	F10	D6V	T26V
A07	D6P	T26I	D03	Wt	T26V	F11	D6A	T26I
A08	D6H	wt	D04	D6L	wt	F12	D6A	T26A
A09	D6V	T26V	D05	D6L	T26A	G01	D6A	wt
A10	D6A	wt	D06	D6A	T26A	G02	D6L	T26I
A11	D6L	wt	D07	Wt	T26L	G03	wt	T26V
A12	D6L	T26A	D08	Wt	T26I	G04	D6H	T26A
B01	D6Q	T26L	D09	D6A	T26I	G05	D6H	T26L
B02	D6H	T26L	D10	D6A	T26A	G06	D6V	T26A
B03	D6L	T26L	D11	D6A	wt	G07	D6A	T26V
B04	D6A	T26V	D12	D6P	T26P	G08	D6E	wt
B05	D6E	wt	E01	D6Q	T26L	G09	D6A	T26I
B06	D6E	T26L	E02	Wt	T26I	G10	D6A	wt
B07	D6V	T26A	E03	D6V	T26P	G11	D6V	T26A
B08	D6H	wt	E04	D6E	T26A	G12	D6V	T26A
B09	D6A	T26L	E05	D6A	wt	H01	D6H	wt
B10	D6E	T26V	E06	D6H	T26L	H02	D6P	T26L
B11	Wt	wt**	E07	D6V	T26L	H03	D6A	T26I
B12	D6L	T26V	E08	Wt	T26I	H04	D6H	T26L
C01	D6H	T26A	E09	D6E	T26V	H05	D6V	T26L
C02	D6A	T26A	E10	D6A	wt	H06	D6E	T26L
C03	D6L	wt	E11	D6A	T26I	H07	D6L	T26V
C04	D6V	T26L	E12	D6P	wt	H08	D6V	T26L
C05	D6A	T26L	F01	D6E	T26I	H09	D6A	T26V
C06	D6L	T26V	F02	wt	wt	H10	D6A	wt
C07	D6E	T26A	F03	D6L	T26A	H11	D6A	wt
C08	D6A	wt	F04	D6L	T26A	H12	D6Q	T26I

\*= Startcodon mutiert, \*\*= falsch positiv FSA wt



### 5.6.7. Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening der FSA D6X/T26X *Hit-Library* mit Aceton und Propanal.

Die in 5.6.6 erstellten *Hit-Library* wurde mittels dünnschichtchromatographischem Hochleistungs-Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 132., Tabelle 30.). Zur besseren Darstellung wurden Helligkeit und Farbsättigung angepasst.



**Abb. 132.** Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening der *Hit-Library* mit Aceton und Propanal als Substrat nach 6 h Reaktionszeit. Anfärbung mit Anisaldehyd-Lösung. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet.

**Tabelle 30.** Densitometrische Analyse bei 600 nm des *Hit-Library Screenings* mit Aceton und Propanal.

Reihe A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6Q/ T26L	D6H/ T26L	D6L/ T26L	D6A/ T26V	D6E/ 	D6E/ T26L	D6V/ T26A	D6H	D6A/ T26L	D6E/ T26V	D6L/ T26V	D6H/ T26A
<b>Farbdichte</b>	1806	2329	2578	6619	13941	5473	13201	14976	3557	5671	6246	13333

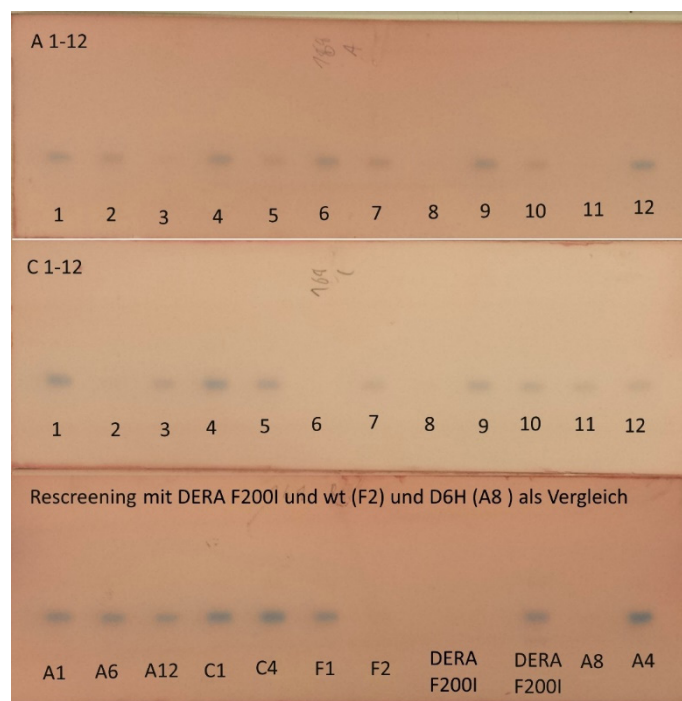
Reihe C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6A/ T26A	D6L	D6V/ T26L	D6E/ T26A	D6A	D6V/ T26V	T26V	D6L/ T26A	T26L	D6A/ T26I	D6P/ T26L	D6Q/ T26I
<b>Farbdichte</b>	23472	26092	6992	25200	27249	2807	11198	21022	8155	3585	1373	3928

Rescreening												
Position	A5	A8	F1	F2	D2	D5	A7	A12	D1	D4	D7	D8
<b>Mutation</b>	D6E	D6H	D6A/ T26A	wt	D6L	D6A	D6V/ T26A	D6H/ T26A	D6A/ T26A	D6E/ T26A	T26V	D6L/ T26A
<b>Farbdichte</b>	15168	16830	15771	3924	18365	15150	9083	7489	0	3799	604	5500
<b>Rf 0,1</b>												
<b>Umsatz in %, bezogen auf D6E</b>	<b>100</b>	111	104	26	121	100	60	49	0	25	4	36

### 5.6.8. Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening der FSA D6X/T26X *Hit-Library* und DERA F200I mit Propanal

Die in 5.6.6 erstellten *Hit-Library* wurde mittels dünnschichtchromatographischem Hochleistungs-Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 133., Tabelle 31.). Als Substrat wurde nur Propanal verwendet. Zur besseren Darstellung wurden Helligkeit und Farbsättigung angepasst.



**Abb. 133.** Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening der *Hit-Library*-Masterplatte mit Propanal als Substrat nach 6 h Reaktionszeit. DERA F200I wurde als Kontrolle verwendet. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Färbung Anisaldehyd-Lösung verwendet.

**Tabelle 31.** Densitometrische Analyse bei 615 nm des *Hit-Library*-Screenings mit Propanal

Reihe A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6Q/ T26L	D6H/ T26L	D6L/ T26L	D6A/ T26V	D6E	D6E/ T26L	D6V/ T26A	D6H	D6A/ T26L	D6E/ T26V	D6L/ T26V	D6H/ T26A
<b>Farbdichte</b>	10168	7092	2385	10373	5563	10249	7608	682	1066	5852	643	11431

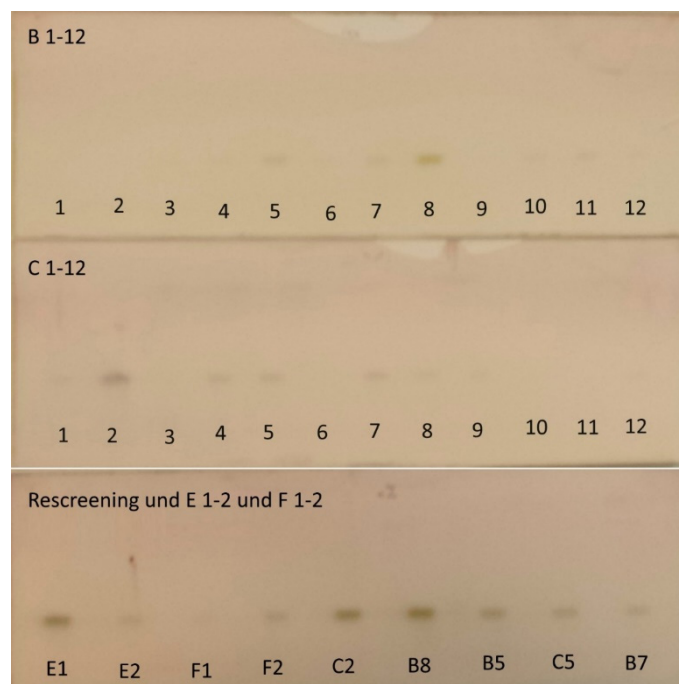
Reihe C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6A/ T26A	D6L	D6V/ T26L	D6E/ T26A	D6A	D6V/ T26V	wt/ T26V	D6L/ T26A	wt/ T26L	D6A/ T26I	D6P/ T26L	D6Q/ T26I
<b>Farbdichte</b>	12428	2012	6550	12337	8854	223	5250	1079	7117	5792	4402	6309



<i>Rescreening</i>											
Position	A1	A6	A12	C1	C4	F1	F2	H1- H2	H3	A8	A4
Mutation	D6Q/ T26L	D6E/ T26L	D6H/ T26A	D6A/ T26A	D6E/ T26A	D6P/ T26I	wt	DERA F200I	DERA F200I	D6H	D6A/ T26V
Farbdichte	10366	9937	8708	13584	14817	10674	1095	0	10016	840	14025
Umsatz in %, bezogen auf DERA F200I	103	99	87	136	148	107	11	-	100	8	140

### 5.6.9. Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening der FSA D6X/T26X der *Hit-Library* mit Aceton und Isovaleraldehyd

Die in 5.6.6 erstellten *Hit-Librarys* wurde mittels dünnschichtchromatographischem Hochleistungs-Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 134, Tabelle 32.). Statt Propanal wurde Isovaleraldehyd (4,5 µl, 75,2 mM) verwendet. Zur besseren Darstellung wurde Helligkeit und Farbsättigung erhöht.



**Abb. 134.** Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening der *Hit-Library* mit Aceton und Isovaleraldehyd als Substrat nach 5 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Färbung wurde Anisaldehyd-Lösung verwendet.

**Tabelle 32.** Densitometrische Analyse bei 450 nm des *Hit-Library-Screenings* von Aceton mit Isovaleraldehyd

Reihe B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6Q/ T26L	D6H/ T26L	D6L/ T26L	D6A/ T26V	D6E	D6E/ T26L	D6V/ T26A	D6H	D6A/ T26L	D6E/ T26V	D6H/ T26A	D6L/ T26V
<b>Farbdichte</b>	510	432	1013	2416	8534	2811	6472	17840	917	4424	5770	2455

Reihe C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6A/ T26A	D6L	D6V/ T26L	D6E/ T26A	D6A	D6V/ T26V	Wt/ T26V	D6L/ T26A	Wt/ T26L	D6A/ T26I	D6P/ T26L	D6Q/ T26I
<b>Farbdichte</b>	2505	12757	547	6398	7422	352	5000	3196	3044	706	321	3193

<i>Rescreening</i>												
<b>Position</b>	E1	E2	F1	F2	C2	A8	A5	C5	A7			
<b>Mutation</b>	D6H	wt	D6A/ T26A	wt	D6L	D6H	D6E	D6A	D6V/ T26A			
<b>Farbdichte</b>	21882	5633	2505	7060	21882	24484	13834	9717	7238			

<b>Umsatz in %, bezogen auf D6H</b>	89	23	10	29	89	<b>100</b>	57	40	30			
-------------------------------------	----	----	----	----	----	------------	----	----	----	--	--	--

### 5.6.10. Dünnschichtchromatographisches *Screening* der FSA D6X/T26X *Rescreening-Library* mit Acetaldehyd

Die in 5.6.5 erstellte *Rescreening-Library* wurde mittels dünnschichtchromatographischem *Screening* analysiert (AAV. 23, Abb. 135). Als Substrat wurde nur Acetaldehyd (176 mM) verwendet. In Well H3 wurde zusätzlich noch Propanal (75 mM) als Verfahrenskontrolle hinzugegeben. DC-Platte 2 wurde statt mit Anisaldehyd mit Cersulfat-Lösung angefärbt.



**Abb. 135.** Dünnschichtchromatographisches *Screening* der *Rescreening-Library* mit Acetaldehyd als Substrat nach 6 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1 verwendet. Reihe 1 und 3-12 wurden mit Anisaldehyd-Lösung, Reihe 2 mit Cersulfatlösung angefärbt. H3 enthält Propanal als Verfahrenskontrolle.

### 5.6.11. Dünnschichtchromatographisches Screening der FSA D6X/T26X *Hit-Library* mit Butanal

Die in 8.6.5 erstellten *Hit-Library* wurde mittels dünnschichtchromatographischem Screening analysiert (AAV. 23, Abb. 136.). Als Substrat wurde nur Butanal (110 mM) verwendet.



**Abb. 136.** Dünnschichtchromatographisches Screening der *Hit-Library* mit Butanal als Substrat nach 6 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Die mit Bleistift markierten Stellen waren für ein paar Sek. andersfarbig.

### 5.6.12. Screening der *Hit-Library* mit Butanon und 3-Hydroxybutanal

Die in 5.6.6 erstellten *Hit-Library* wurde mittels dünnsschichtchromatographischem Hochleistungs-Screening analysiert (AAV. 25). Als Substrat wurde 3-Hydroxybutanal-Lösung (20 mM) und Butanon (115 mM) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 24 h. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Es konnten keine neuen Produktpots beobachtet werden.

### 5.6.13. Screening der *Hit-Library* mit 3-Pentanon und 3-Hydroxybutanal

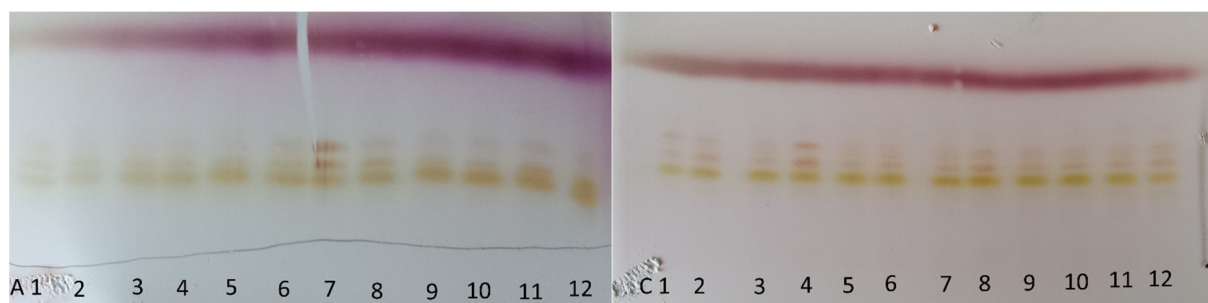
Die in 5.6.6 erstellten *Hit-Library* wurde mittels dünnsschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening analysiert (AAV. 25). Als Substrat wurde 3-Hydroxybutanal-Lösung (20 mM) und 3-Pentanon (99 mM) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 24 h. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Es konnten keine neuen Produktpots beobachtet werden. Die restliche Lyselösung des *Wells* FSA D6A/T26I wurde mit TEA Puffer (50 mM, pH 8,3) und Propanal (75 mM) als Verfahrenskontrolle verwendet. Sie war positiv.

### 5.6.14. Screening der *Hit-Library* mit Cyclohexanon und 3-Hydroxybutanal

Die in 5.6.6 erstellten *Hit-Library* wurde mittels dünnsschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening analysiert (AAV. 25). Als Substrat wurde 3-Hydroxybutanal-Lösung (20 mM) und Cyclohexanon (100 mM) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 24 h. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung verwendet. Es konnten keine neuen Produktpots beobachtet werden.

### 5.6.15. Screening der *Hit-Library* mit Cyclopentanon und 3-Hydroxybutanal

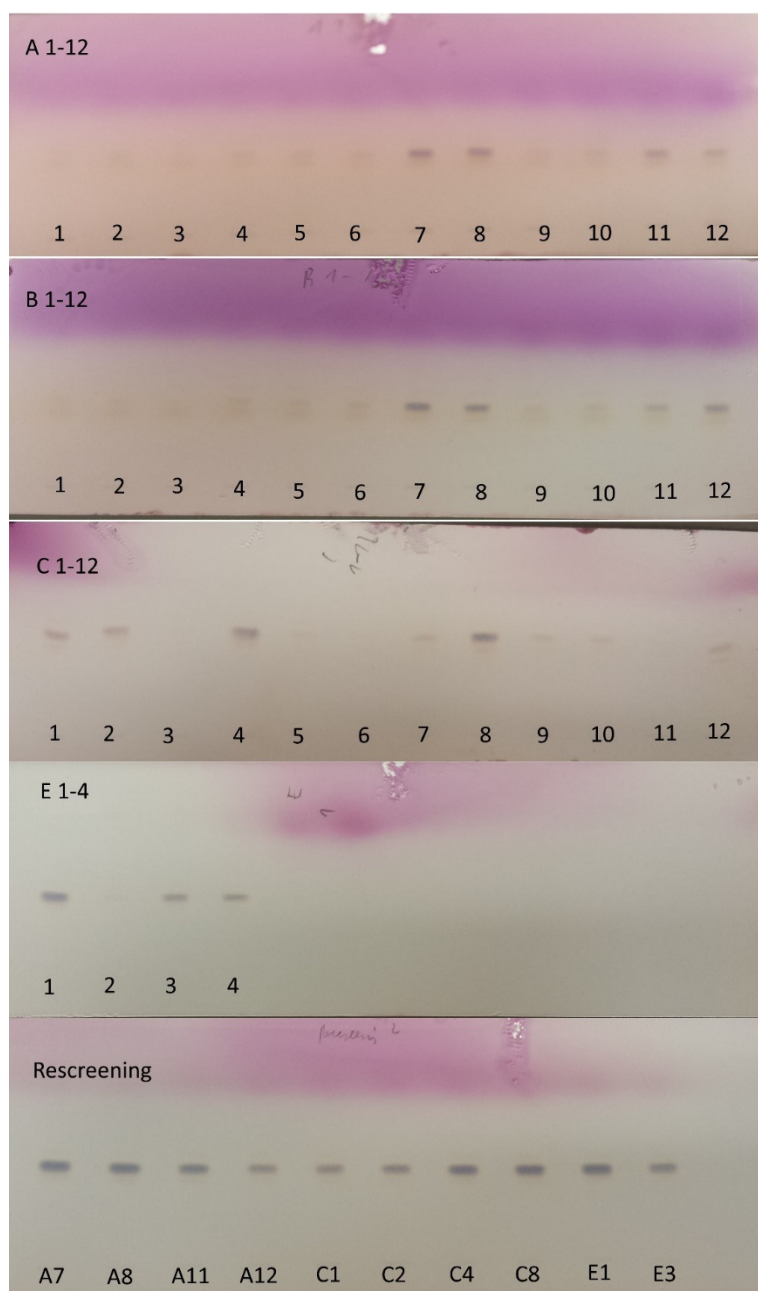
Die in 5.6.6 erstellten *Hit-Library* wurde mittels dünnsschichtchromatographischem Hochleistungs-Screening analysiert (AAV. 25, Abb. 137.). Als Substrate wurde 3-Hydroxybutanal-Lösung (20 mM) und Cyclopentanon (100 mM) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 24 h. Als Laufmittel wurde EtOAc/Cy, 1:1, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung benutzt. Neue Produktpots konnten detektiert werden.



**Abb. 137.** Dünnschichtchromatographisches Screening der *Hit-Library* mit Cyclopentanon and Hydroxybutanal. Als Laufmittel wurde  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10:1, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung verwendet.

### 5.6.16. Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening von Cyclopentanon mit (S)-3-Hydroxypentanon

Ein Hochleistungs-Screening der *Hit-Library* wurde in dreifacher Ausfertigung vorbereitet (AAV. 25). In E3 und E4 wurde als zusätzliche Kontrolle FSA D6N (aus dem Arbeitskreis von Pere Clapés) inokuliert. Nun wurden die Zellen aus den drei 96-Well-Platten vereinigt und lysiert (900 µl Lysepuffer/Well). Nach der Lyse wurde die Mikrotiterplatte bei 65 °C inkubiert (30. Min) und nach Abkühlen auf RT zentrifugiert (2540 g, 30 Min.). Ein Teil des Überstandes aus jedem Well (600 µl) wurde in eine neue 96-Well-Platte überführt und mit (S)-3-Hydroxybutanal-Lösung (20 mM) und Cyclopentanon (100 mM) versetzt. Anschließend wurde die Platte für 6 h inkubiert (40 °C. 900 rpm). Nun wurden die Proben mittels Hochleistungs-Screening (AAV. 25, Abb. 138., Tabelle 33.) vermessen.



**Abb. 138.** Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening der *Hit-Library* mit Cyclopentanon und (3S)-3-Hydroxybutanal. Als Laufmittel wurde DCM/MeOH, 10:1, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung verwendet.

**Tabelle 33.** Densitometrische Analyse des neuen Produktsots der FSA-katalysierten Reaktion von Cyclopentanon mit (*S*)-3-Hydroxybutanal bei 600 nm.

Reihe A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6Q/ T26L	D6H/ T26L	D6L/ T26L	D6A/ T26V	D6E	D6E/ T26L	D6V/ T26A	D6H	D6A/ T26L	D6E/ T26V	D6L/ T26V	D6H/ T26A
<b>Farbdichte</b>	170	343	0	330	416	434	3155	2654	290	350	1809	1448

Reihe B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6Q/ T26L	D6H/ T26L	D6L/ T26L	D6A/ T26V	D6E	D6E/ T26L	D6V/ T26A	D6H	D6A/ T26L	D6E/ T26V	D6H/ T26A	D6L/ T26V
<b>Farbdichte</b>	245	263	0	376	406	640	6284	5484	531	644	2447	5264

Reihe C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Mutation</b>	D6A/ T26A	D6L	D6V/ T26L	D6E/ T26A	D6A	D6V/ T26V		D6L/ T26A		D6A/ T26L	D6P/ T26L	D6Q/ T26I
<b>Farbdichte</b>	2749	2985	0	2589	284	0	696	4975	412	437	0	759

Reihe E	1	2	3	4
<b>Mutation</b>	D6H	wt	D6N	D6N
<b>Farbdichte</b>	9394	166	5008	4712

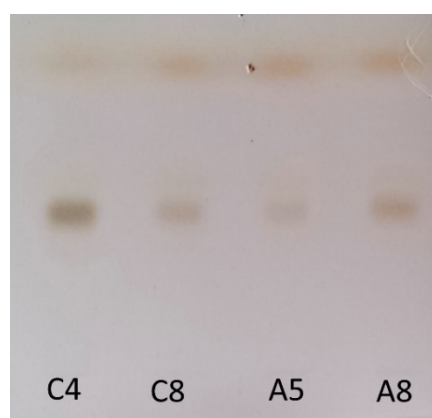
Rescreening											
<b>Position</b>	A7	A8	A11	A12		C1	C2	C4	C8	E1	E3
<b>Mutation</b>	D6V/ T26A	D6H	D6L/ T26L	D6H/ T26A		D6A/ T26A	D6L	D6E/ T26A	D6L/ T26A	D6H	D6N
<b>Farbdichte</b>	11375	10526	8418	5408		5239	6356	9545	10114	10233	6800
<b>Umsatz in %, bezogen auf D6H</b>	108,1	<b>100,0</b>	80,0	51,4		49,8	60,4	90,7	96,1	97,2	64,6



Anschließend wurden die schnellen *fsa*-Mutanten D6E, D6H, D6E/T26A, D6L/T26A exprimiert und lysiert (AAV. 26). Ein Teil des Überstandes (200 µl) wurde mit TEA-Puffer (300 µl, 50 mM, pH 7,5), Cyclopentanon (100 mM) und (*S*)-3-Hydroxybutanal (20 mM) vermischt. Nach einstündiger Inkubation (37 °C) wurde ein Teil jeder Probe (50 µl) in eine 96-Well-Platte überführt. In jedes dieser *Wells* wurde MeOH (50 µl) hinzugegeben. Die Platte wurde mit Acetatfolie verschlossen und bei RT inkubiert (20 Sek. 1200 *rpm*). Anschließend wurde die Platte zentrifugiert (2254 g, 30 Min.) und aus jedem Well eine Probe auf eine DC-Platte aufgetragen (4 µl/Well, 6 mm Bandenbreite *CAMAG-Autosampler*). Die Platte wurde mit einer Heizpistole vorsichtig getrocknet und in einer DC-Kammer entwickelt (Isopropanol/DCM 1:10). Die entwickelte DC-Platte wurde mit Anisaldehyd-Lösung im Trockenofen angefärbt (110 °C, ca. 90 Sek.) und densitometrisch analysiert (Abb. 139., Tabelle 34.). Die Proteinkonzentration wurde per Bradford-Test (AAV. 7) bestimmt und in die Auswertung mit einbezogen.

**Tabelle 34.** Densitometrische Analyse des neuen Produktsports der FSA katalysierten Reaktion von Cyclopentanon mit (*S*)-3-Hydroxybutanal

Position	Mutation	Farbdichte 600 nm	Umsatz in % bezogen auf D6H
C4	D6E/T26A	13322	329
C8	D6L/T26A	9758	241
A5	D6E	2186	54
A8	D6H	4044	100



**Abb. 139.** Dünnschichtchromatographisches Hochleistungs-Screening von FSA D6H, D6E, D6L/T26A, D6E/T26A mit Cyclopentanon und (*S*)-3-Hydroxybutanal nach 1 h Reaktionszeit. Als Laufmittel wurde Isopropanol/DCM, 1:10, zur Anfärbung Anisaldehyd-Lösung verwendet.



## 5.7. Enzymatische und Chemische Synthesen

### 5.7.1. Allgemeine Arbeitsanweisungen

Alle NMR-Messungen wurden mit der *MestReNova 7* Software ausgewertet. Die Kalibrierung erfolgte auf den Lösungsmittelpeak, bei Lösungsmittelgemischen auf den Chloroform-Peak. Zur besseren Lesbarkeit wurde bei der Darstellung der chemischen Verschiebung die englische Schreibweise gewählt, bei der das Dezimaltrennzeichen durch einen Punkt symbolisiert wird.

### AAV. 27 Präparative enzymatische Reaktion A

In einem Reaktionsgefäß wurde FSA (35 mg) in TEA-Puffer (100 ml, 50 mM, pH 7,4) gelöst und mit DTT (2 mM) versetzt. Nun wurden die Substrate hinzugegeben, die Reaktion bei RT gerührt und nach ihrem Ende mit dem dreifachen Volumen an Aceton, Ethanol oder Methanol versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde bei -20 °C inkubiert (3 h), zentrifugiert (4000 g, 20 Min.), der Überstand abdekantiert und das Lösungsmittel teilweise evaporiert. Das verbleibende Öl wurde erneut zentrifugiert (16000 g, 3 Min.), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und das Lösemittel vollständig evaporiert. Die zurückbleibende Masse wurde mit CHCl<sub>3</sub> (10 ml) im Ultraschallbad aufgeschwemmt, der Überstand in ein neues Gefäß dekantiert und das Lösungsmittel evaporiert. Das verbleibende Öl wurde per NMR analysiert.

### AAV. 28 Präparative enzymatische Reaktion B

In einem Reaktionsgefäß wurde FSA (35 mg) in TEA-Puffer (100 ml, 50 mM, pH 7,4) gelöst und mit DTT (2 mM) versetzt. Nun wurde entweder Propanal (140 mM) oder Butanal (45 mM) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 3 Tage (bei Propanal) oder für 5 Tage (bei Butanal) geschlossen gerührt und anschließend mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung (1 mM) sowie Proteinase K (51 U) versetzt. Der pH-Wert wurde mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung - falls nötig - auf pH 7,0 eingestellt. Der Kolben wurde bei 55 °C inkubiert (2 h), die trübe Lösung wurde klar. Anschließend wurde mit Ethylacetat (4 x 60 ml) vorsichtig extrahiert (bei größeren Volumina bis zu achtmal (DC-Kontrolle)). Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Das farblose Öl wurde per NMR analysiert und/oder weiter verwendet.

### AAV. 29 Reduktion von Aldehyden mit Natriumborhydrid

In einem Reaktionsgefäß wurde der Aldehyd (1 Äq) in MeOH (1,4 ml pro 1 mmol Substrat) gelöst und unter Rühren portionsweise mit NaBH<sub>4</sub> (1.5 Äq) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde gesättigte NaCl-Lösung (2 ml pro ml MeOH) hinzugegeben und das ausgefallene Salz mit VE-Wasser (ca. 4 ml pro ml MeOH) wieder in Lösung gebracht. Es erfolgte eine viermalige Extraktion mit EtOAc (1 ml pro ml Lösung), sechsmalig bei Ansätzen über 200 ml (DC-Kontrolle). Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel evaporiert<sup>[129]</sup>.

---

### AAV. 30 Racemisierung von 3-Hydroxyaldehyden

In einem Reaktionsgefäß wurde das 3-Hydroxyaldehyd-Rohprodukt aus AAV. 28 in VE-Wasser (40 ml/g Aldehyd) gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge (0,1 M) auf 9,3 eingestellt. Es erfolgte eine Inkubation unter Rühren bei RT (18 h), die Reduktion der Aldehyde erfolgte mittels NaBH<sub>4</sub> (AAV. 29). Dabei wurde die doppelte Menge an Reduktionsmittel (3 Äq) verwendet.

### AAV. 31 Schützung von 1,3-Diolen mit Aceton

Das Diol (1 Äq.) wurde in - über MgSO<sub>4</sub> getrocknetem - Aceton (2,83 ml/mmol) gelöst und mit 2,2-Dimethoxypropan (2,83 ml/mmol) versetzt. Es wurden aktivierte Molekularsieve (3 Å, 2 g/20 ml) und *p*-Toluolsulfonsäure (0,03 Äq) hinzugeführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Septum verschlossen und für 2,5 h bei RT vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2,83 ml/mmol) hinzugegeben und ausgefallenes Salz mit VE-Wasser wieder in Lösung gebracht. Es erfolgte eine Extraktion mit Diethylether (3 x gleiches Volumen). Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert, evaporiert<sup>[133]</sup> und per NMR analysiert.

### AAV. 32 Präparative Synthese mit ganzen Zellen in PBS-Puffer

In einem Reaktionsgefäß wurde lyophilisierte BL21 (DE3)-Zellen (250 mg Zellen, ca. 15 mg FSA D6E) aus AAV. 6 in 2 x PBS-Puffer (15 ml, pH 7.0) suspendiert und mit Aceton (3,6 M), Aldehyde (1 ml) und DTT (2 mM) versetzt. Die Suspension wurde für 4 Tage bei RT gerührt und anschließend zentrifugiert (3087 g, 20 Min.). Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Diethylether (3 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der ölige Rückstand konnte mittels NMR analysiert werden.

### AAV. 33 Präparative enzymatische Synthese mit lyophilisierten Zellen in organischem Lösungsmittel

In einem Reaktionsgefäß wurde in TEA-Puffer (50 mM, pH 7,0) lyophilisierte BL21 (DE3)-Zellen (250 mg Zellen, ca. 15 mg FSA D6E) aus AAV. 6 in über MgSO<sub>4</sub> getrocknetem Diethylether bzw. MTBE (100 ml/g Zellen) suspendiert und mit TEA-Pufferlösung (1 ml/100 ml Lösungsmittel, 1M, pH 7,4) versetzt. Nun wurden die Substrate hinzugegeben und die Reaktion bei RT mit einem schwebenden Rührfisch gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel abdekantiert und evaporiert. Das zurückbleibende viskose Öl wurde zentrifugiert (16000 g, 10 Min.), der Überstand wurde abdekantiert und mittels NMR analysiert.

### AAV. 34 Aufreinigung von kleinen Enzymreaktionen mittels Membranfiltration

Für die Entfernung von Enzymen mittels Ultrafiltration wurde die Reaktionslösung in eine VIVASPIN 500 (10000 Da MWCO) überführt und in dieser zentrifugiert (12000 g, 5 Min.). Der Durchfluss wurde weiterverwendet.

### 5.7.2. Synthese von (5*S*,6*R*)-5,6,8-Trihydroxyoctan-4-on mittels FSA L163A

In einen Rundkolben wurden TEA-Puffer (10 ml, 50 mM, pH 8,4), 1-Hydroxypentan-2-on<sup>[138][139]</sup> (350 mg, 343 mM) und 3-Hydroxypentanal-Lösung (1750  $\mu$ l, 1 M) gegeben. Der pH-Wert wurde erneut auf 8,4 eingestellt. Nun wurde FSA L163A (200 mg) hinzugegeben, bei RT für 48 h gerührt und nach AAV 27 aufgearbeitet. Die übrige Flüssigkeit wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cy, 1:1). Anschließend erfolgte eine erneute Aufreinigung mit einer Umkehrphasensäule (C18) und Wasser als Laufmittel. Das Wasser wurde evaporiert und von dem Rückstand ein NMR angefertigt (Abb. 140.).

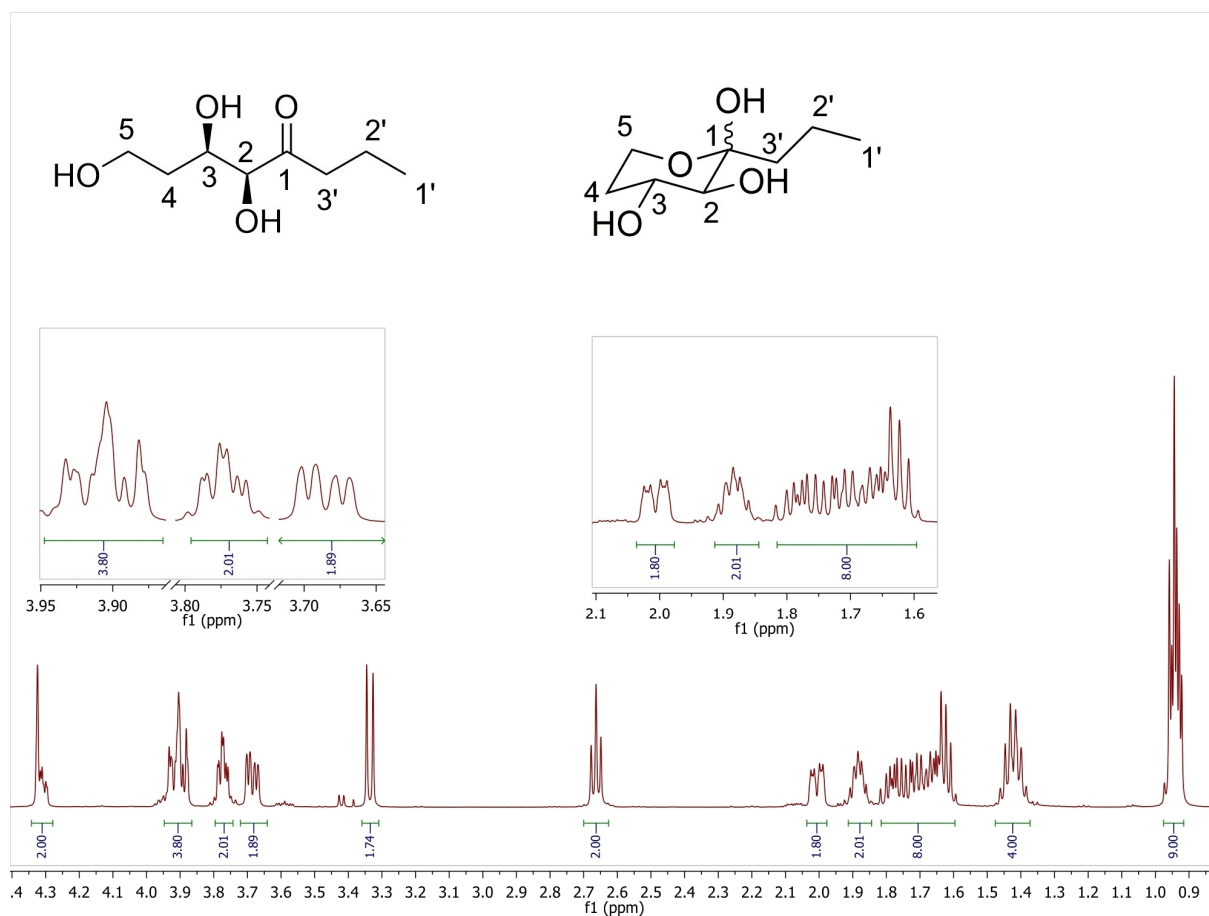
**Ansatz:** 350 mg 1-Hydroxypentan-2-on (3,42 mmol), Reaktionszeit 2 d  
**Ausbeute:** 12,1 % (73 mg, 0,414 mmol)

**Offenkettige Form (ca. 33%): <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  = 0.93 (t, 3H,  $J$  (1'/2') = 7.4 Hz, H-1'), 1.60-1.80 (m, 2H, H-2'), 1.89 (m, 2H, H-4), 2.66 (t, 2H,  $J$  (3'/2') = 7.3 Hz, H-3'), 3.77 (m, 2H, H-5), 4.31 (m, 1H, H-3), 4.32 (s, 1H, H-2)

**Ringform (ca. 66 %): <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  = 0.94 (t, 3H,  $J$  (1'/2') = 7.4 Hz, H-1'), 1.42 (m, 2H, H-2'), 1.60-1.80 (m, 3H, H-3', H-4<sub>a</sub>), 2.01 (m, 2H, H-4<sub>eq</sub>), 3.34 (d, 1H,  $J$  (2/3) = 9.4 Hz, H-2), 3.69 (dd, 2H,  $J$  (5/4) = 5.0,  $J$  (5/4) = 11.8 Hz, H-5<sub>eq</sub>), 3.91 (m, 3H, H-3, H-5<sub>a</sub>)

**Offenkettige Form: <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  = 12.88 (C-1'), 16.54 (C-2'), 35.15 (C-4), 40.41 (C-3'), 58.29 (C-5), 68.48 (C-3), 79.27 (C-2), 215.22 (C-1)

**Ringform: <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  = 13.57 (C-1'), 15.66 (C-2'), 32.68 (C-4), 39.83 (C-3'), 58.56 (C-5), 68.27 (C-3), 75.87 (C-2), 99.48 (C-1)



**Abb. 140.** NMR-Spektrum von (5*S*,6*R*)-5,6,8-Trihydroxyoctan-4-on

### 5.7.3. Synthese von (4R)-4-Hydroxyhexan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen

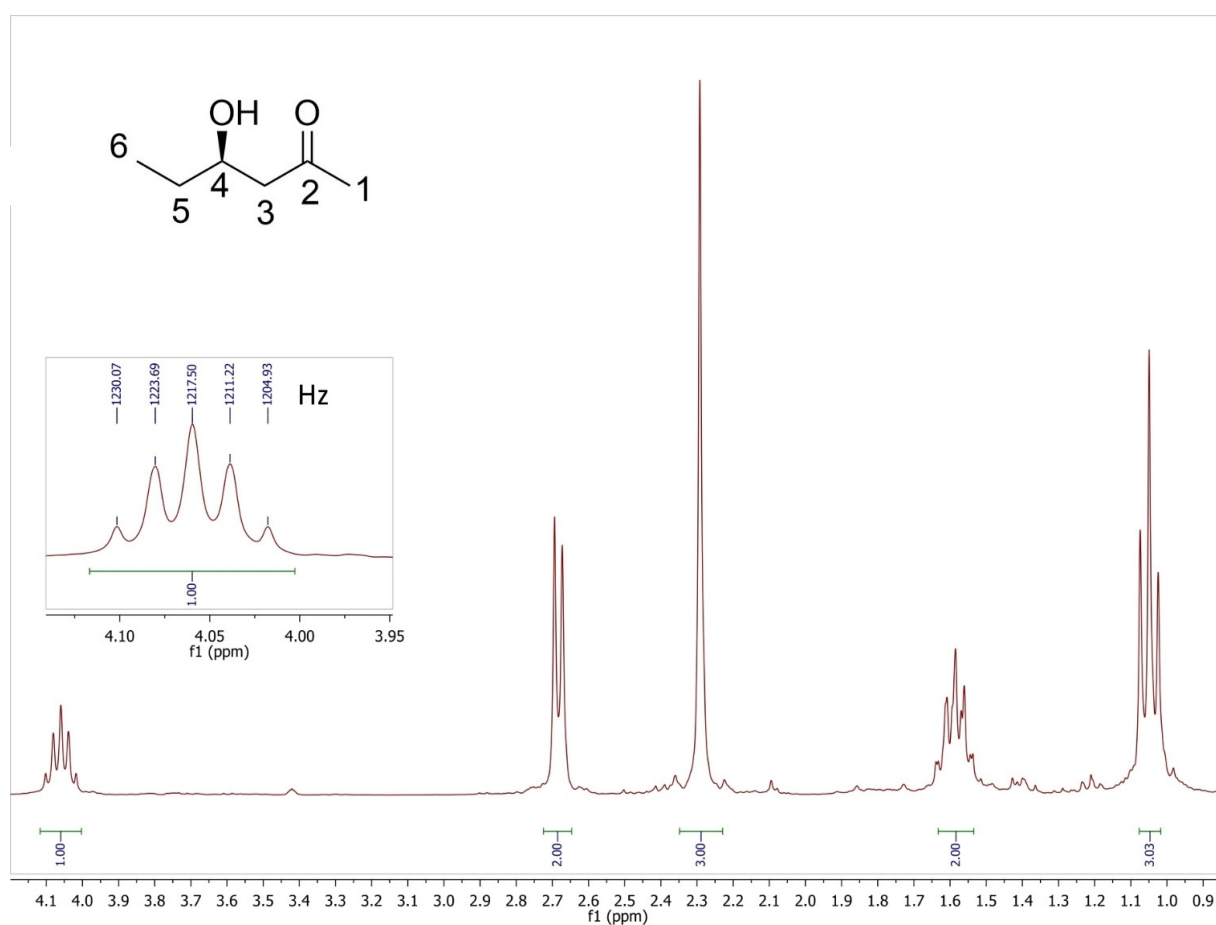
Synthese von (4R)-4-Hydroxyhexan-2-on aus Aceton und Propanal nach AAV. 32.

**Ansatz:** 810 mg (13.94 mmol) Propanal  
184 mg Zellen mit FSA D6E (ca. 11 mg FSA)

**Ausbeute:** 33.93 % (550 mg, 4,73 mmol)

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 1.05 (t, 3H,  $J$  (6/5) = 7.5 Hz, H-6), 1.58 (m, 2H, H-5), 2.29 (s, 3H, H-1), 2.68 (d, 2H,  $J$  (3/4) = 6,4 Hz, H-3), 4.06 (tt, 1H, H-4)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 10.24 (C-6), 30.80 (C-1), 30.93 (C-5), 51.23 (C-3), 70.05 (C-4), 210.80 (C-2)



**Abb. 141.** NMR-Spektrum von (4R)-4-Hydroxyhexan-2-on

#### 5.7.4. Synthese von (4*R*)-4-Hydroxyheptan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen

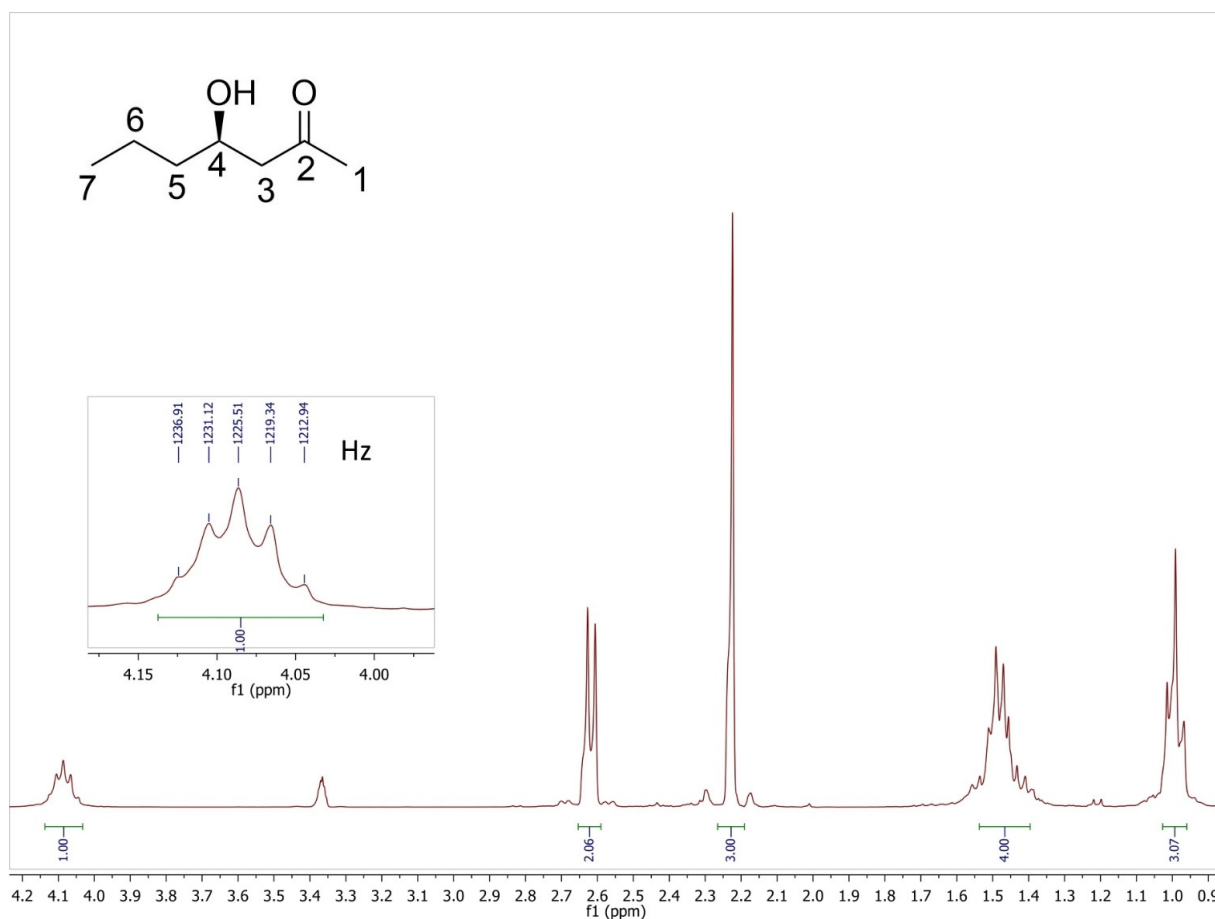
Synthese von (4*R*)-4-Hydroxyheptan-2-on aus Aceton und Butanal nach mit FSA D6E in ganzen Zellen nach AAV. 32.

**Ansatz:** 800 mg (11.09 mmol) Butanal  
193 mg Zellen mit FSA D6E (ca. 11,6 mg FSA)

**Ausbeute:** 9.73 % (141 mg, 1,08 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 0.99 (t, 3H,  $J$  (7/6) = 7.1 Hz, H-7), 1.47 (m, 4H, H-5,6), 2.22 (s, 3H, H-1), 2.61 (d, 2H,  $J$  (3/4) = 6.1 Hz, H-3), 4.08 (tt, 1H, H-4)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 14.33 (C-7), 19.75 (C-6), 30.71 (C-1), 40.60 (C-5), 51.86 (C-3), 68.60 (C-4), 210.85 (C-2)



**Abb. 142.** NMR-Spektrum von (4*R*)-4-Hydroxyheptan-2-on

### 5.7.5. Synthese von (4R)-4-Hydroxyoctan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen

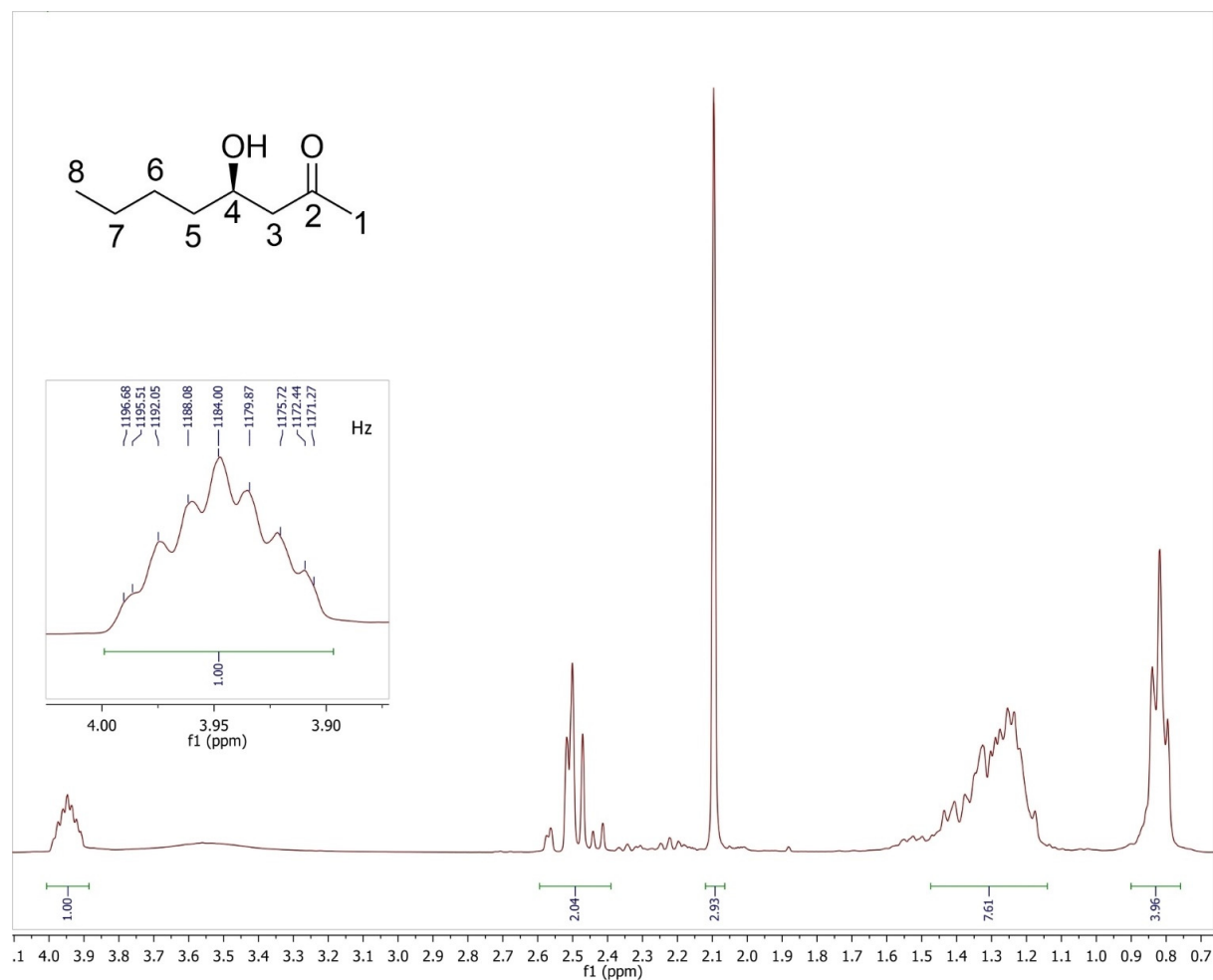
Synthese von (4R)-4-Hydroxyoctan-2-on aus Aceton und Valeraldehyd mit FSA D6E in ganzen Zellen nach AAV. 32 (Reaktionszeit 6 d).

**Ansatz:** 810 mg (9,40 mmol) Valeraldehyd  
250 mg Zellen mit FSA D6E (ca. 15 mg FSA)

**Ausbeute:** 18,4 % (250 mg, 1,73 mmol)

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 0.81 (t, 3H,  $J$  = 6.4 Hz, H-8), 1.15–1.48 (m, 6H, H-5, 6, 7), 2.09 (s, 3H, H-1), 2.50 (m, 2H, H-3), 3.95 (tt, 1H,  $J$  = 7.4, 3.4 Hz, H-4)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 13.95 (C-8), 22.56 (C-7), 27.60 (C-6), 30.69 (C-1), 36.20 (C-5), 50.08 (C-3), 67.57 (C-4), 209.89 (C-2)



**Abb. 143.** NMR-Spektrum von (4R)-4-Hydroxyoctan-2-on

### 5.7.6. Synthese von (4R)-4-Hydroxy-6-methylheptan-2-on mittels FSA D6E in ganzen Zellen

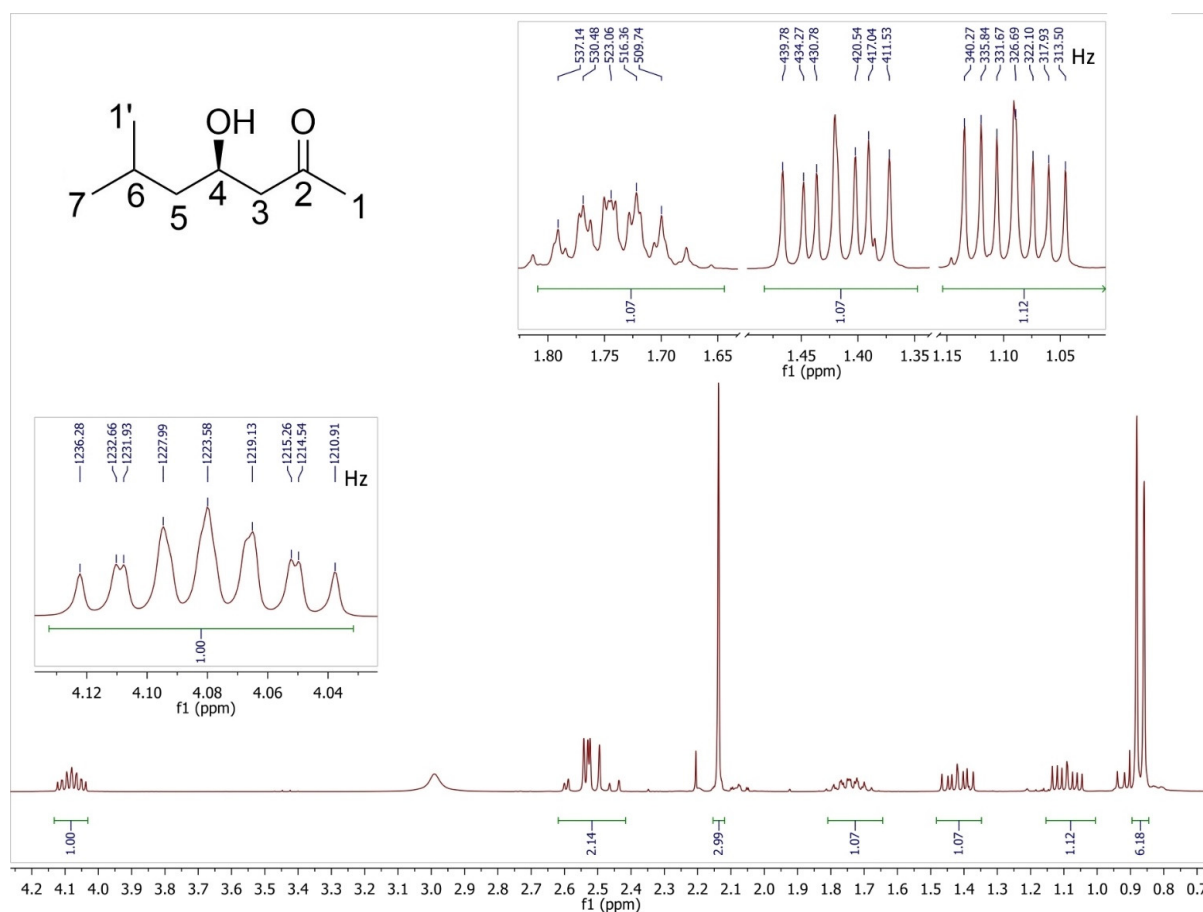
Synthese von (4R)-4-Hydroxy-6-methylheptan-2-on aus Aceton und Isovaleraldehyd nach AAV. 32 mit FSA D6E in ganzen Zellen.

**Ansatz:** 800 mg (9,28 mmol) Isovaleraldehyd  
191 mg Zellen mit FSA D6E (ca. 11,5 mg FSA)

**Ausbeute:** 21.22 % (284 mg, 1,97 mmol)

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 0.87 (d, 6H,  $J(7/1',6) = 6.6$  Hz, H-7/1'), 1.09 (ddd, 1H,  $J(5b,5a) = 13.7$ ,  $J(5b,4) = 4.4$ ,  $J(5b,6) = 8.6$  Hz, H-5b), 1.42 (ddd, 1H,  $J(5a,5b) = 13.7$ ,  $J(5a,4) = 9.0$ ,  $J(5a,6) = 5.5$  Hz, H-5a), 1.74 (m, 1H,  $J(6,5a) = 5.5$ ,  $J(6,5b) = 8.6$ ,  $J(6,7/1') = 6.6$  Hz, H-6), 2.13 (s, 3H, H-1), 2.52 (dd, 2H,  $J(3a,3b) = 17.6$ ,  $J(3a,4) = 8.4$  Hz, H-3a), 2.52 (dd, 2H,  $J(3b,3a) = 17.6$ ,  $J(3b,4) = 3.6$  Hz, H-3b), 4.08 (dddd, 1H,  $J(4,5b) = 4.4$ ,  $J(4,3b) = 3.5$ ,  $J(4,3a) = 8.1$ ,  $J(4,5a) = 8.9$  Hz, H-4)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 22.06 (C-6), 23.35 (C-7/1'), 24.39 (C-7/1'), 30.84 (C-1), 45.58 (C-5), 50.57 (C-3), 65.69 (C-4), 210.15 (C-2)



**Abb. 144.** NMR-Spektrum von (4R)-4-Hydroxy-6-methylheptan-2-on



#### 5.7.7. Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels Natriumhydroxid

In einem Reaktionsgefäß wurde eine NaOH-Lösung (2,5 mM) vorgelegt und mit Aceton (7,9 g, 136 mmol) und Propanal (8,1 g, 139 mmol) versetzt. Die Reaktionszeit betrug 24 h. Mittels DC-Analyse konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden (Vorschrift angelehnt an<sup>[96]</sup>). Nun wurde erneut Natriumhydroxid (24 mg, 8,5 mM Gesamtkonzentration) hinzugegeben und für 24 h gerührt. Mittels dünnschichtchromatographischer Analyse konnte die Bildung eines, von Farbe und Laufverhalten zu 4-Hydroxyhexan-2-on identischen Spots, zusammen mit drei weiteren Nebenprodukten nachgewiesen werden. Auf eine Aufreinigung wurde verzichtet.

---

### 5.7.8. Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels LDA

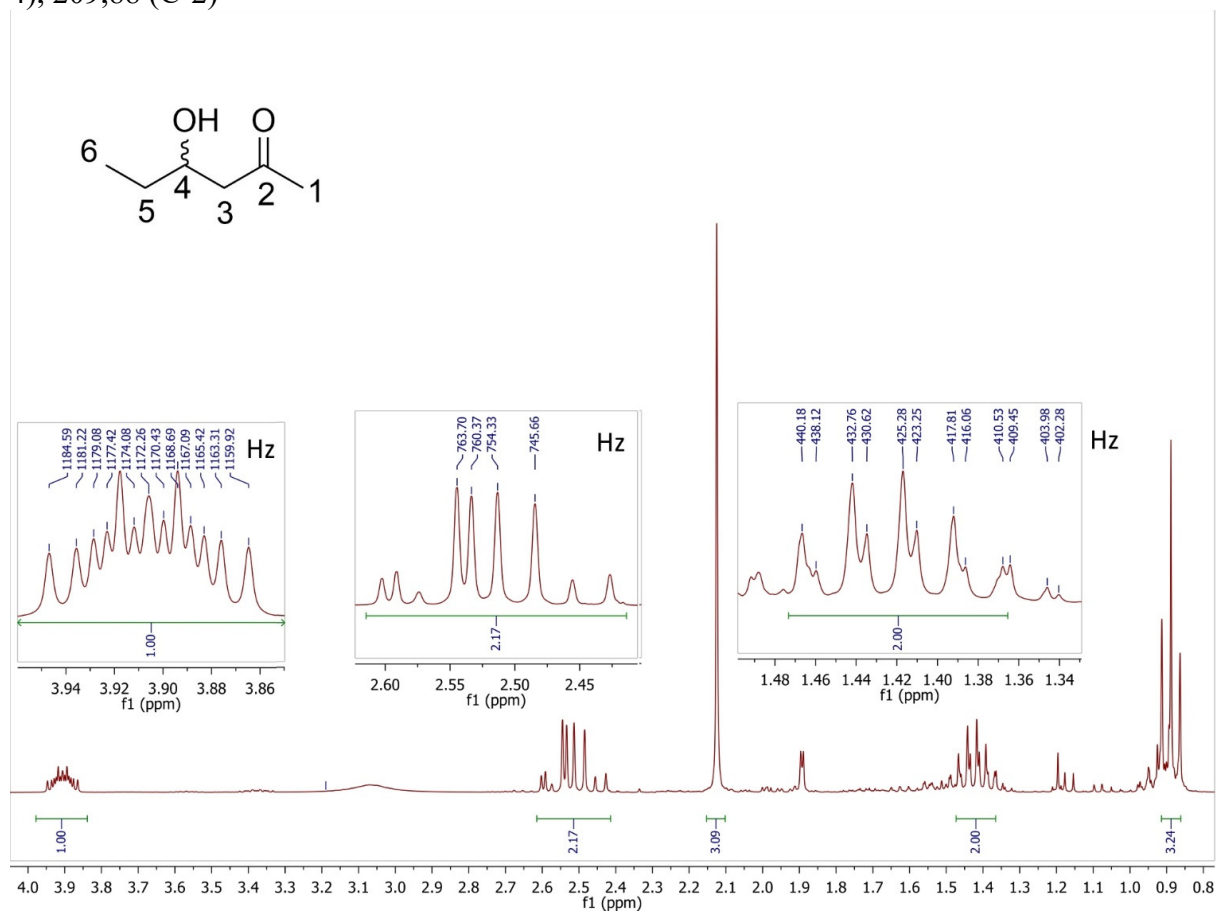
In einem unter - Argonstrom ausgeheizten - Dreihalskolben wurde trocknes THF (19 ml) vorgelegt. Der Kolben wurde unter Argonatmosphäre im Aceton/Trockeneisbad auf - 78 °C gekühlt. Nun wurde in THF-gelöstes LDA (51 ml, 2 M, 99 mmol) hinzugeben. Nach Abkühlung wurden in THF-gelöstes trockenes Aceton (5,21 g Aceton in 30 ml THF, 90 mmol) hinzugegeben. Nun erfolgte eine langsame, tropfenweise Zugabe von, in THF-gelöstem, trockenem Propanal (5,18 g in 30 ml THF, 90 mmol). Nach 40 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumchlorid-Lösung (120 ml, ges.) beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat (4 x 40 ml) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C evaporiert<sup>[129]</sup>. Das durch dünnschichtchromatographische Analyse aus zwei Hauptkomponenten bestehende orangefarbene Öl (12,85 g Rohausbeute) wurde - im Ölpumpenvakuum - fraktioniert destilliert. Von der saubersten Fraktion wurde ein NMR angefertigt (Abb. 145.).

**Ansatz:** 5,184 g (89,25 mmol) Propanal

**Ausbeute:** 1,44 % (150 mg, 1,29 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.89 (t, 3H,  $J$  (6/5) = 7.5 Hz, H-6), 1.37-1.48 (m, 2H,  $J$  = 7.4, 2.0 Hz, H-5), 2.12 (s, 3H, H-1), 2.52 (d, 2H, H-3), 3.91 (m, 1H, H-4)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 9,81 (C-6), 29,39 (C-1), 30,77 (C-5), 49,66 (C-3), 68,90 (C-4), 209,88 (C-2)



**Abb. 145.** NMR-Spektrum von 4-Hydroxyhexan-2-on

### 5.7.9. Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels Gasstromeinleitung von Propanal in Aceton

Eine Gaswaschflasche wurde mit Propanal befüllt (12 ml) und an eine weitere Gaswaschflasche, welche Aceton (94 ml) und methanolische Kaliumhydroxydlösung (1 M, 6 ml) enthielt, angeschlossen. Die Flasche mit Aceton wurde mit Eis gekühlt. Anschließend wurde ein leichter Stickstoffstrom so durch die Gaswaschflasche mit Propanal geleitet, dass er das Propanal aufnimmt und anschließend von unten durch die Gaswaschflasche mit Aceton leitet. Nachdem der Gasstrom das Propanal vollständig evaporiert hatte, wurde die Gaswaschflasche mit Aceton mit in MeOH-gelöster Oxalsäure (300 mg in 10 ml MeOH, 2,38 mmol) versetzt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abfiltriert und das nicht reagierte Aceton bei 40 °C evaporiert<sup>[100]</sup>. Der Rückstand (7,63 g) wurde nun unter Unterdruck (10 mbar) fraktioniert destilliert. Von der saubersten Fraktion wurde ein NMR angefertigt (Abb. 146.).

**Ansatz:** 9,72 g (176 mmol) Propanal

**Ausbeute:** 0,85 % (durch Peak Integration bestimmt, 175 mg, 1,49 mmol)

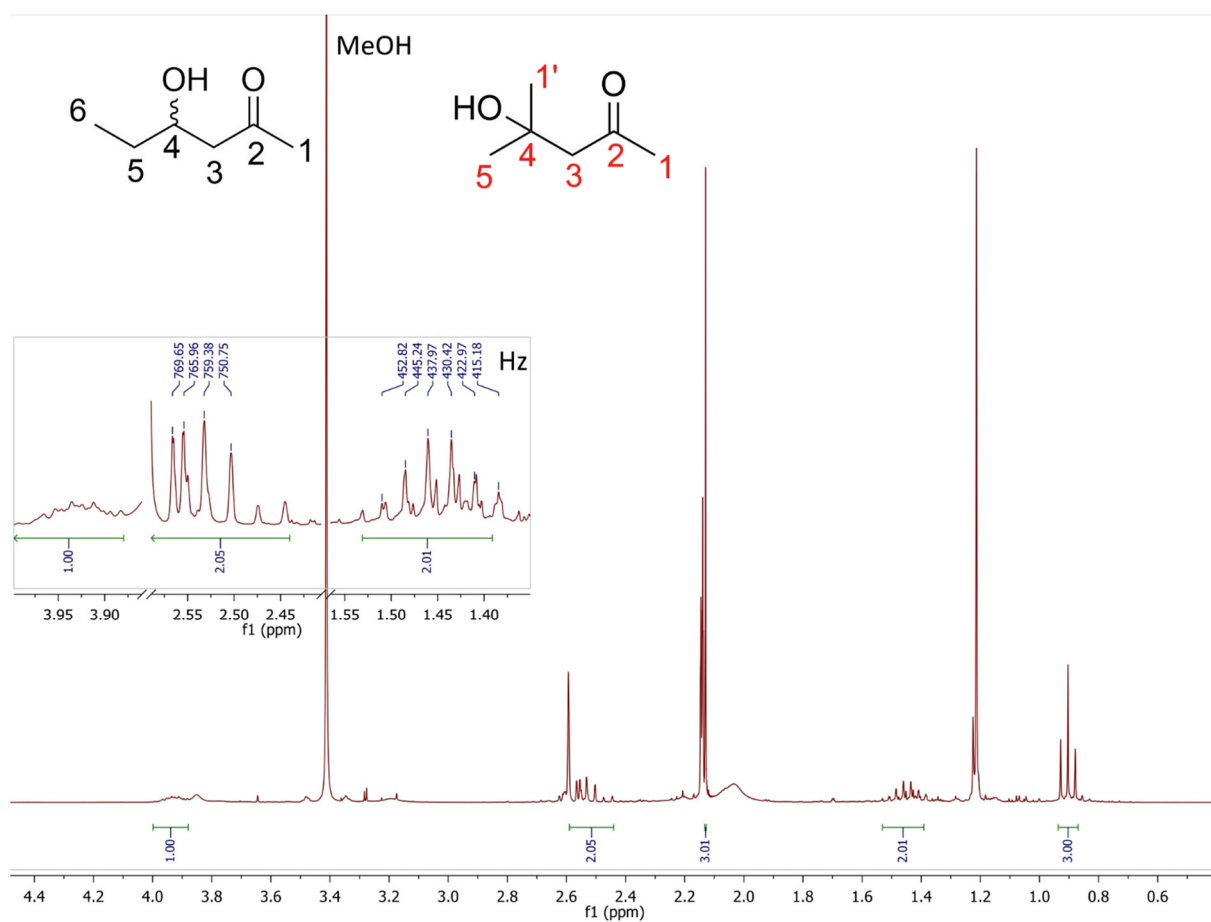
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.89 (t, 3H,  $J$  (6/5) = 7.5 Hz, H-6), 1.37-1.48 (m, 2H,  $J$  = 7.4, 2.0 Hz, H-5), 2.12 (s, 3H, H-1), 2.52 (d, 2H, H-3), 3.91 (m, 1H, H-4)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 9.80 (C-6), 29.39 (C-1), 30.76 (C-5), 49.65 (C-3), 68.90 (C-4), 209.87 (C-2)

4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on entsteht als Nebenprodukt im Verhältnis 1:1, welches aufgrund seines sehr ähnlichen Polarität und Reaktivität, sowie seines ähnlichen Siedepunktes nicht abgetrennt werden konnte:

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 1.21 (s, 6H, H-5/1'), 2.13 (s, 3H, H-1), 2.14-2.15 (d, 2H, H-3)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 29.27 (C-5/1'), 30.94 (C-1), 53.93 (C-3), 69.72 (C-4), 211.04 (C-2)



**Abb. 146.** NMR-Spektrum von 4-Hydroxyhexan-2-on und 4-Hydroxy-3-methylpentan-2-on-Verunreinigungen

#### 5.7.10. Synthese von 4-Hydroxyhexan-2-on mittels L-Prolin-Katalyse

In einem Reaktionsgefäß wurde Aceton (100 ml) mit Propanal (139 mmol) versetzt und auf 4 °C gekühlt. Nun wurde L-Prolin (13,72 mM) hinzugegeben<sup>[151]</sup>. Nach 18 h Reaktionszeit wurde ein Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Das gelbe Öl wurde dünnschichtchromatographisch analysiert. Es scheinen verschiedene neue Produkte entstanden zu sein. Auf eine Aufreinigung wurde aufgrund der zu erwartenden, schwierigen Trennung verzichtet.

---

### 5.7.11. Synthese von (2*R*,3*R*)-2-Methylpentan-1,3-diol mittels FSA D6A/T26I

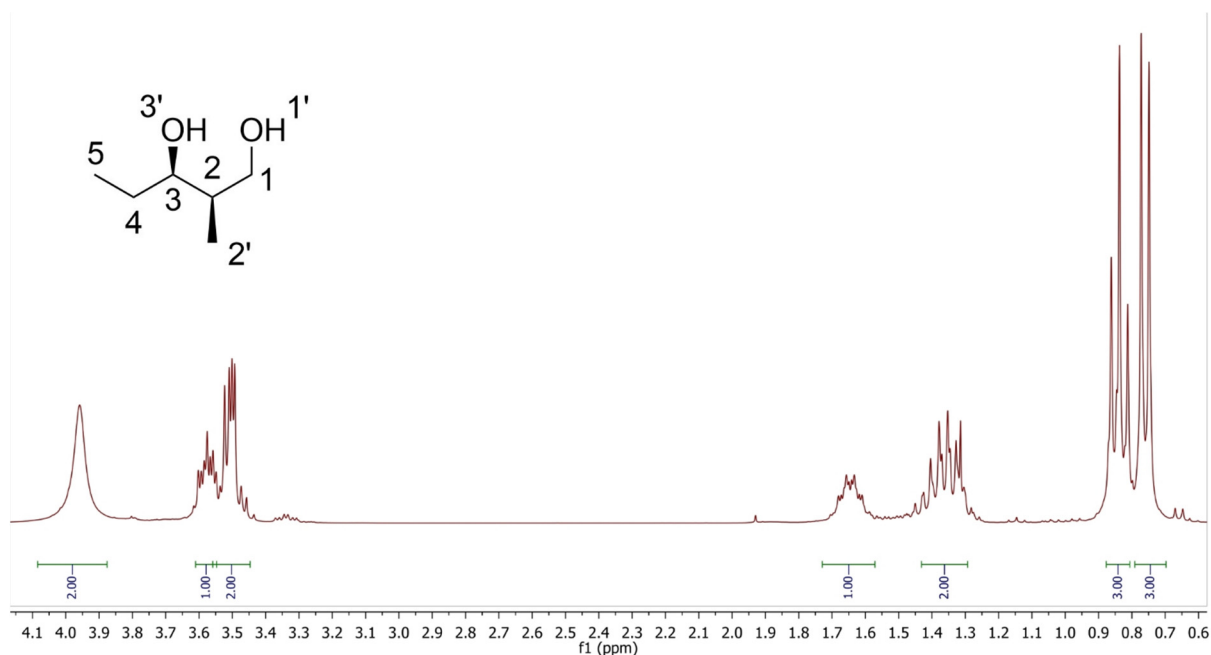
Synthese von (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanal nach AAV. 28 (21 h Reaktionszeit), jedoch ohne Proteinase K-Verdau, Reduktion nach AAV. 29.

**Ansatz:** 1,5 ml (20,92 mmol) Propanal  
 44,8 mg FSA D6A/T26I  
 säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (EtOAc./Cy 1:3)  
 Ausbeute: 230 mg (1,98 mmol, 9,46 %), Reduktion

**Ausbeute:** 10.6 % (130 mg, 1,1 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.79 (d, 3H, *J* = 7.05 Hz, H-2'), 0.84 (t, 3H, *J* = 7.45 Hz, H-5), 1.35 (m, 2H, H-4), 1.65 (m, 1H, H-2), 3.50 (m, 2H, H-1), 3.58 (m, 1H, H-3), 3.96 (brs, 2H, OH-1', OH-3')

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 9.90 (C-5), 10.57 (C-2'), 26.71 (C-4), 38.75 (C-2), 66.19 (C-1), 74.96 (C-3)



**Abb. 147.** NMR-Spektrum von (2*R*,3*R*)-2-Methylpentan-1,3-diol

### 5.7.12. Synthese von 2-Methylpentan-1,3-diol mittels FSA D6A/T26L

Synthese von (3*R*)-2-Methylpentan-1,3-diol aus (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanal (AV. 28 (3d Reaktionszeit) mittels Racemisierung (AAV. 30) und Reduktion (AAV. 29).

**Ansatz:** 1,62 g (27,89 mmol) Propanal  
15 mg FSA D6H/T26L

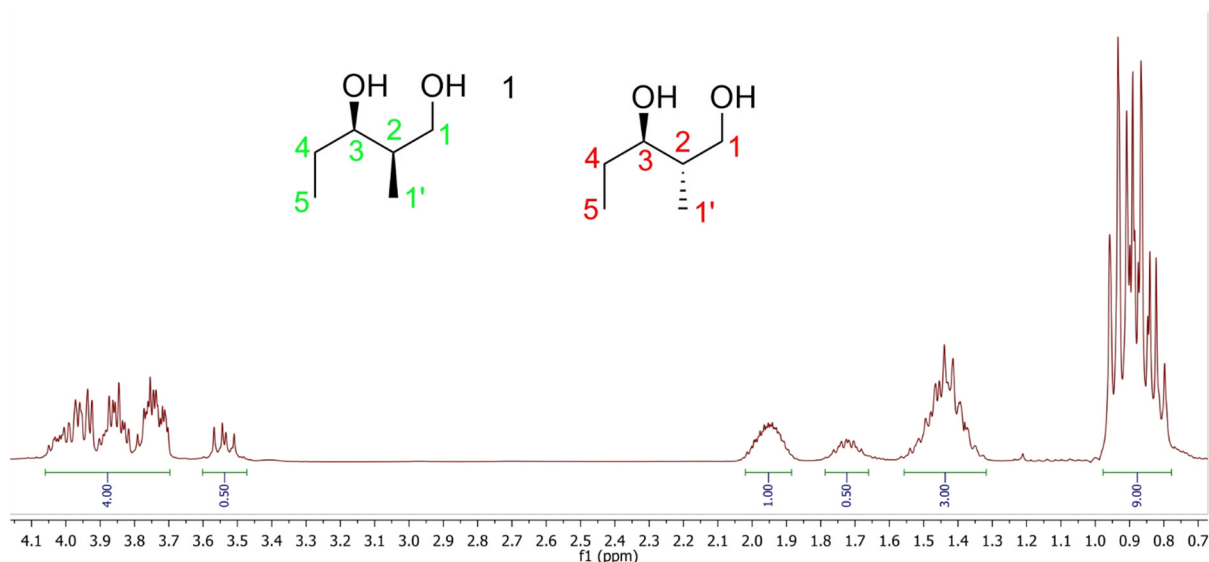
**Ausbeute:** 7,7 % (250 mg) (3*R*)-2-Methylpentan-1,3-diol  
Verhältnis von 2*R*,3*R* zu 2*S*,3*R* ist 1:2

#### (2*R*,3*R*)-2-Methylpentan-1,3-diol

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.88 (m, 6H, H-1', H-5), 1.43 (m, 2H, H-4), 1.72 (m, 1H, H-2), 3.54 (m, 1H, H-3), 3.7 – 4.06 (m, 2H, H-1)

#### (2*S*,3*R*)-2-Methylpentan-1,3-diol

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.88 (m, 6H, H-1', H-5), 1.43 (m, 2H, H-4), 1.95 (m, 1H, H-2), 3.7-4.06 (m, 3H, H-1, H-3)



**Abb. 148.** NMR-Spektrum von 2-Methylpentan-1,3-diol

### 5.7.13. Synthese von (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan

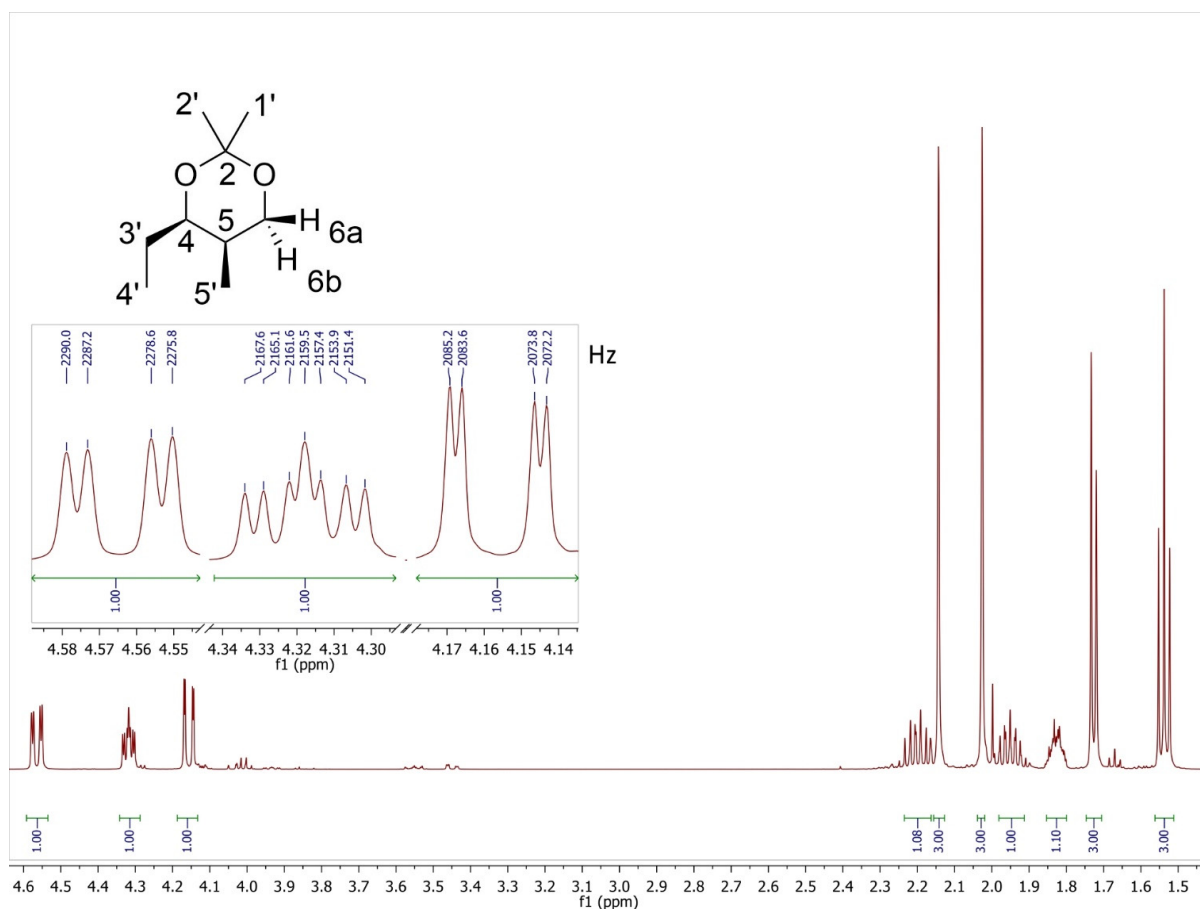
Synthese von (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan aus (2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanal (AAV. 28, Reaktionszeit 3 d), mittels Reduktion (AAV. 30) und Schützung nach (AAV. 31).

**Ansatz:** 8,1 g (139,46 mmol) Propanal  
 100 mg FSA D6A/T26I  
 4,46 g (55,10 %) Rohprodukt Reduktion,  
 4,16 g (91,7 %) Rohprodukt, Schützung,  
 4,68 g (84,0 %) Rohprodukt.  
 1 ml wurde säulenchromatographisch aufgereinigt EtOAc./Cy 1:10,

**Ausbeute:** 29,89 % (300 mg, 1,89 mmol = 9,33 % Gesamtausbeute)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 % C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 1.54 (t, 3H, J (4',3') = 7.4 Hz, H-4'), 1.73 (d, 3H, J (5',5) = 6.8 Hz, H-5'), 1.83 (m, 1H, H-5), 1.95 (ddq, 1H, H-3'a), 2.03 (s, 3H, H-1'), 2.14 (s, 3H, H-2'), 2.20 (ddt, 1H, J (3',4') = 7.4 Hz, H-3'b), 4.16 (dd, J (6b,5) = 1.66 Hz, J (6a,6b) = 11.40 Hz, 1H, H-6a), 4.32 (ddd, 1H, J = 2.5, 6.0, 8.1 Hz, H-4), 4.56 (dd, J (6a,5) = 2.8 , J (6b,6a) = 11.40 Hz, 1H, H-6b)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub> 30 % C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 9.56 (C-4'), 10.33 (C-5'), 18.87 (C-1'), 29.81 (C-3'), 29.80 (C-2'), 31.31 (C-5), 66.65 (C-6), 72.82 (C-4), 98.22 (C-2)



**Abb. 149.** NMR-Spektrum von (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan



### 5.7.14. Synthese von (4R,5R)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

Synthese von (4R,5R)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan aus (2S,3R)-2-Ethyl-3-hydroxyhexanal (AAV. 28, 3 d Reaktionszeit) mittels Reduktion nach (AAV. 30) und Schützung nach (AAV. 31, Extraktionsmittel Cyclohexan).

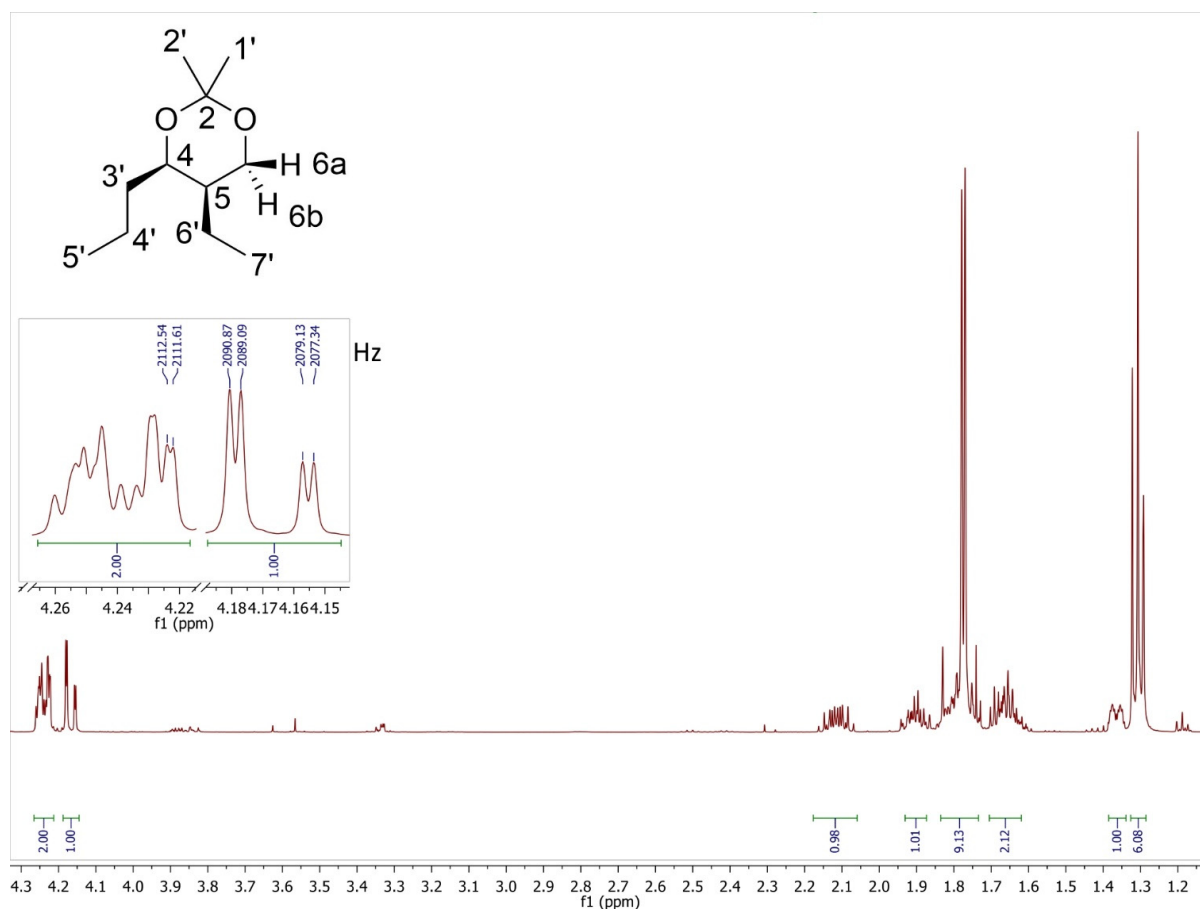
**Ansatz:** 1,6 g (22,18 mmol) Butanal  
 10 mg FSA D6A/T26L  
 430 mg (26,87 %) Rohprodukt, Reduktion  
 440 mg (100,00 %) Rohprodukt, Schützung

**Ausbeute:** 59,46 % (334 mg, 2,11 mmol = 15,8 % Gesamtausbeute)

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 30 %  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):**  $\delta$  = 1.31 (t, 6H,  $J$  = 7.5 Hz, H-5', H-7'), 1.36 (m, 1H,  $J$  = 10.5 Hz, H-5), 1.66 (m, 2H, H-4a', H-6a'), 1.72-1.85 (m, 2H, H-4b', H-6b'), 1.77 (s, 3H, H-1'), 1.78 (s, 3H, H-2'), 1.90 (m, 1H, H-3a'), 2.12 (m, 1H,  $J$  = 3.3 Hz, H-3b'), 4.17 (dd, 1H,  $J$  (6a,5) = 1.75  $J$  (6a,6b) = 11.75 Hz, H-6a), 4.24 (m, 2H, H-4, H-6b).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 12.06 (C-7'), 14.06 (C-5'), 16.15 (C-4'), 18.83 (C-6'), 19.15 (C-1'), 29.79 (C-2'), 34.88 (C-3'), 39.11 (C-5), 62.63 (C-6), 71.94 (C-4), 98.44 (C-2).

**Massenspektrometrie:** ber. für ( $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$ ): 186,1614 g/mol  
 gem. für ( $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$ ): 186,1617 g/mol



**Abb. 150.** NMR-Spektrum von (4R,5R)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

### 5.7.15. Synthese von (4R)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan

Synthese von (4R)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan aus (2S,3R)-3-Hydroxy-2-methylpentanal (AAV. 28, 4 d Reaktionszeit), Racemisierung (AAV. 30) und Schützung (AAV. 31, Extraktion erfolgte 2-mal mit DEE).

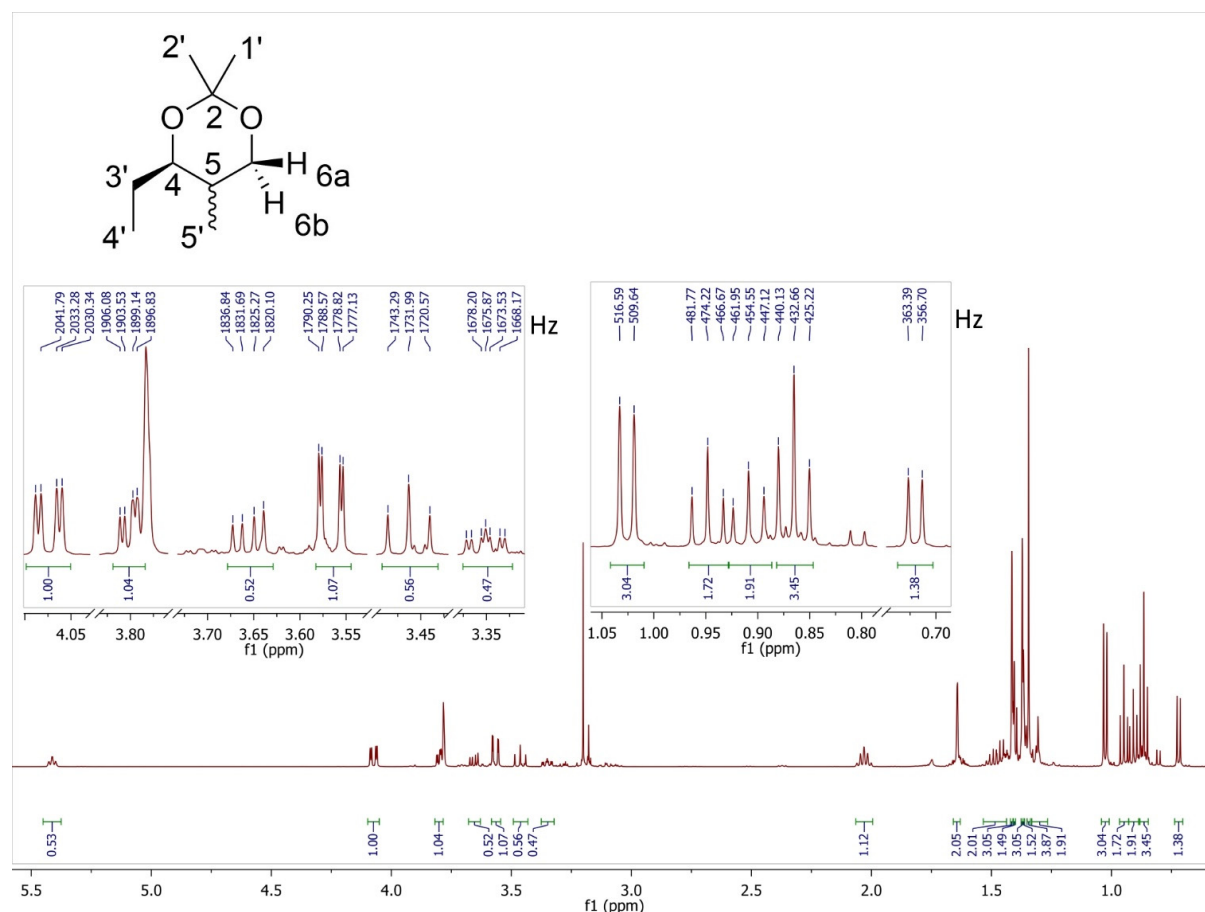
**Ansatz:** 1570 mg (13,29 mmol) 2-Methylpentan-1,3-diol, 4 d Reaktionszeit

**Ausbeute:** 18,20 % (384 mg, 2,42 mmol)

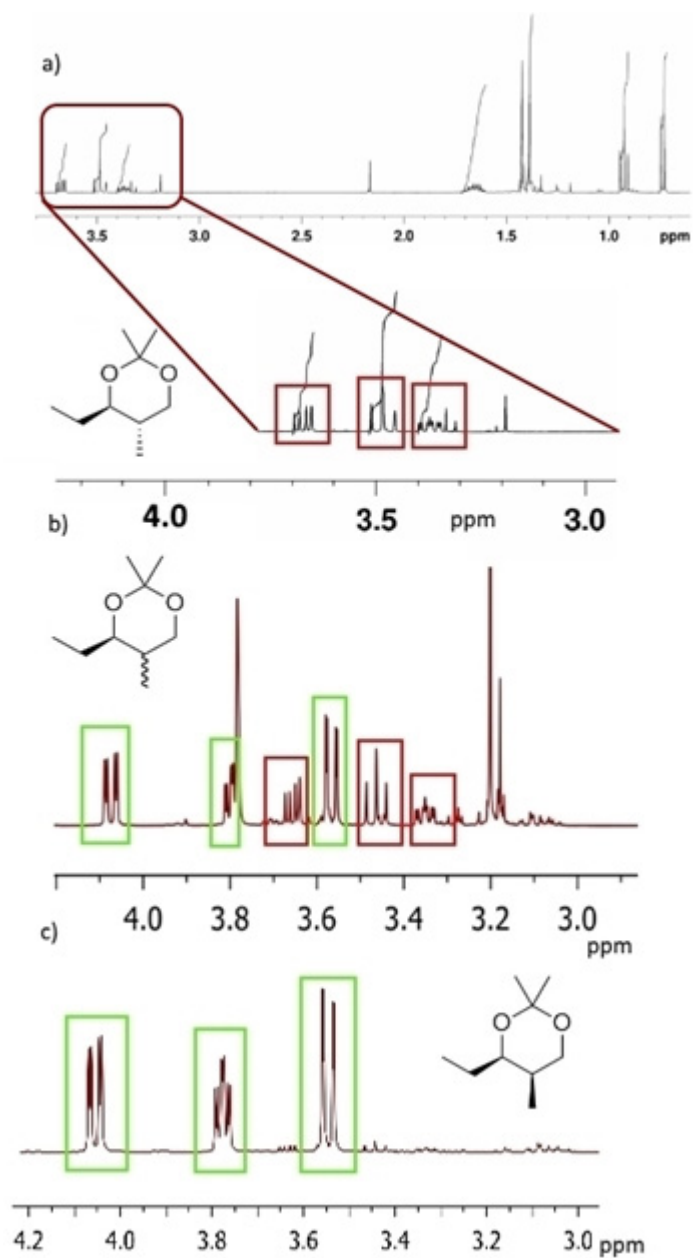
#### (4R,5R)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 0.72 (d, 3H,  $J(5',5) = 6.7$  Hz, H-5'), 0.90 (t, 3H,  $J(4',3') = 7.4$  Hz, H-4'), 1.32 (m, 1H, H-3'a), 1.37 (s, 3H, H-1'), 1.40 (s, 3H, H-2'), 1.46 (m, 1H, H-3'b), 3.35 (ddd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 2.7$ , 8.0, 10.4 Hz, 1H, H-4), 3.46 (dd, 1H,  $J(6b,6a) = 11.3$  Hz,  $J(6b,5) = 11.3$  Hz, H-6b), 3.66 (dd,  $J(6a,6b) = 11.6$ ,  $J(6a,5) = 5.1$  Hz, 1H, H-6a)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 9.39 (C-4'), 12.81 (C-5'), 19.31 (C-1'), 24.58 (C-3'), 25.91 (C-2'), 33.69 (C-5), 66.25 (C-6), 76.26 (C-4), 98.23 (C-2)



**Abb. 151.** NMR-Spektrum von (4R)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan



**Abb. 152.** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR Daten von (4*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan mit (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan aus der Literatur<sup>[133]</sup>

### 5.7.16. Synthese von (4*R*)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

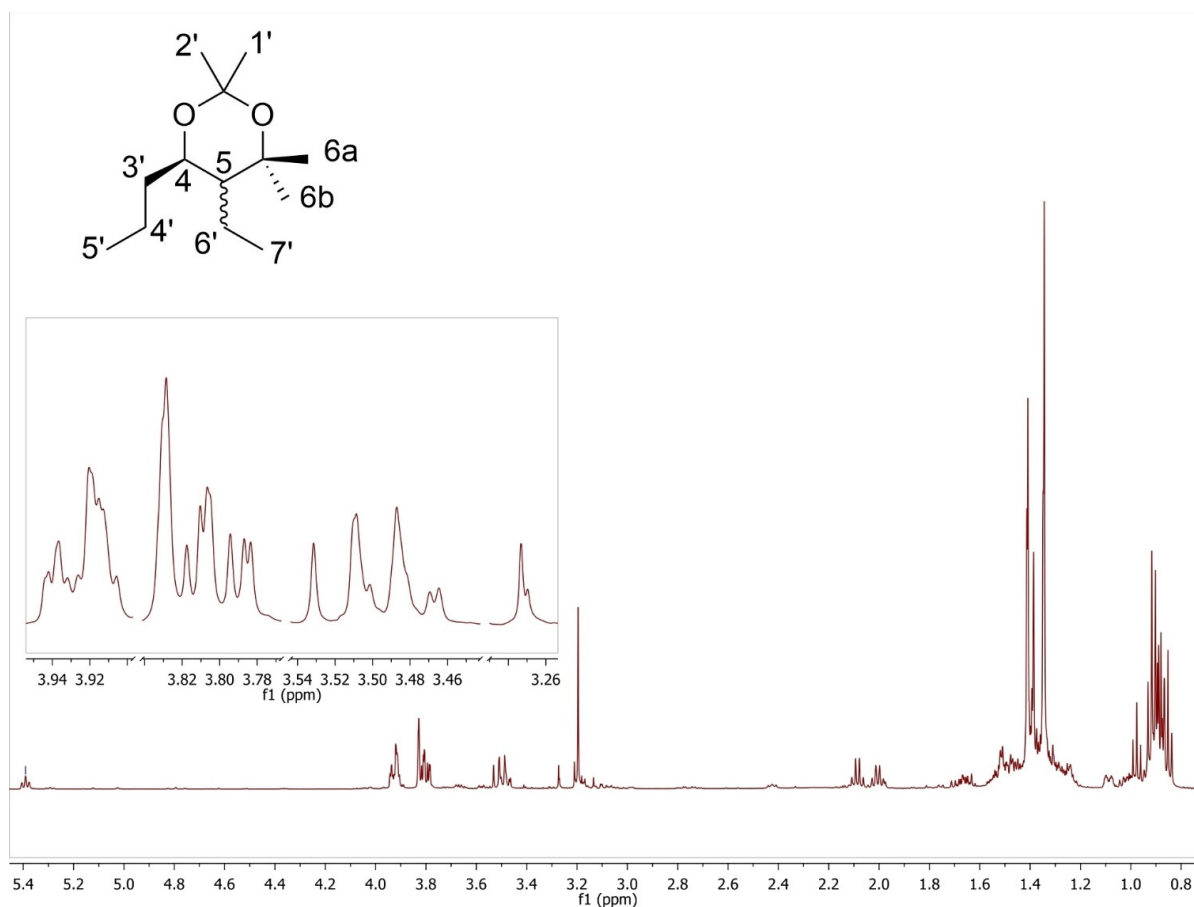
Präparative enzymatische Synthese von (4*R*)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan aus (2*S*,3*R*)-2-Ethyl-3-hydroxyhexanal (AAV. 28), Racemisierung (AAV. 30) und Schützung (AAV. 3,1 Extraktion erfolgte zweimalig mit DEE).

**Ansatz:** 100 mg (0,68 mmol) (2*S*,3*R*)-2-Ethyl-3-hydroxyhexanal

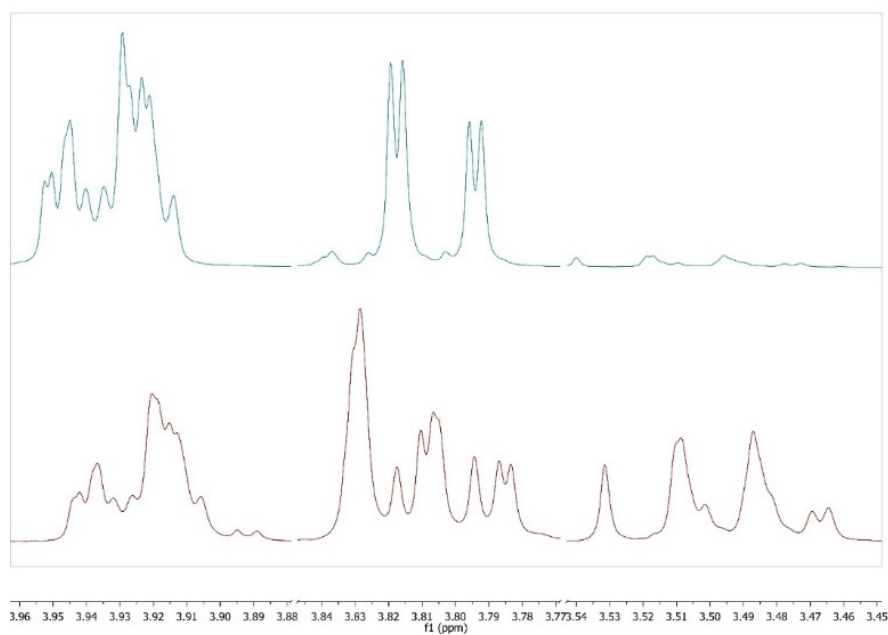
**Ausbeute:** 73,5 % (93 mg, 0,49 mmol)

#### (4*R*,5*S*)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.92 (t, 6H, H-5', H-7'), 1.27 (m, 1H, H-5), 1.34 (m, 2H, H-4a', H-6a'), 1.34 (s, 3H, H-1'), 1.40 (s, 3H, H-2'), 1.51 (m, 2H, H-4b', H-6b'), 1.63 (m, 2H, H-3), 3.51 (m, 1H, H-6a), 3.81 (m, 2H, H-4, H-6b).



**Abb. 153.** NMR-Spektrum von (4*R*)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan



**Abb. 154.** Vergleich der NMR Daten von (4*R*,5*R*)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan mit (4*R*)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

### 5.7.17. Synthese von 2-Methylpent-2-en-1-ol

Synthese von 2-Methylpent-2-en-1-ol aus 2-Methylpent-2-enal (AAV. 29, Extraktion mit DEE).

**Ansatz:** 1003 mg (10,2 mmol) 2-Methylpent-2-enal  
580 mg (15,3 mmol) NaBH<sub>4</sub>

**Ausbeute:** 77,1 % (790 mg, 7,89 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.93 (t, 3H, H-5), 1.62 (s, 3H, H-1'), 2.01 (m, 2H, H-4), 3.94 (s, 2H, H-1), 5.36 (m, 1H, H-3)

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 13.50 (C-5), 14.65 (C-4), 20.92 (C-1'), 68.86 (C-1), 128.09 (C-3), 134.15 (C-2)

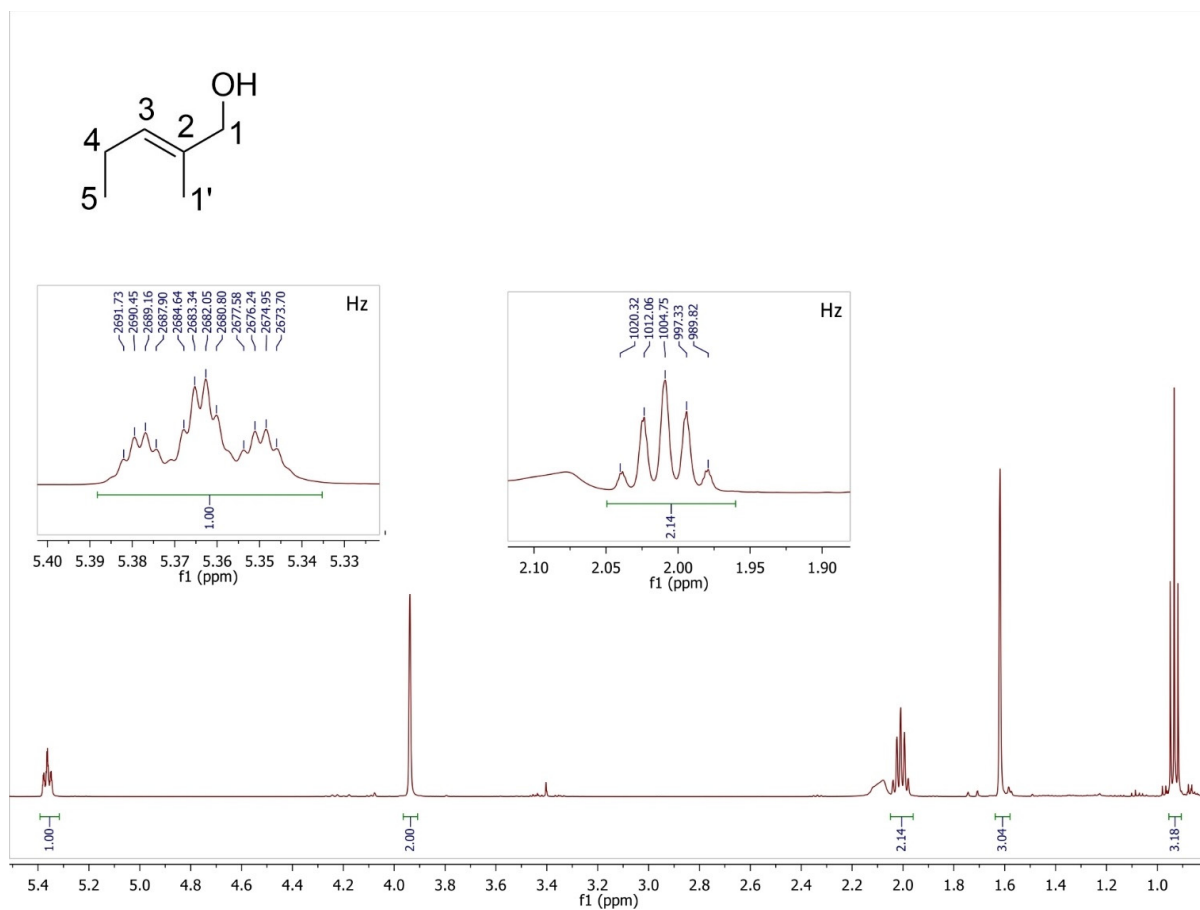


Abb. 155. NMR-Spektrum von 2-Methylpent-2-en-1-ol

### 5.7.18. Synthese von 2-Ethyl-2-hexenol

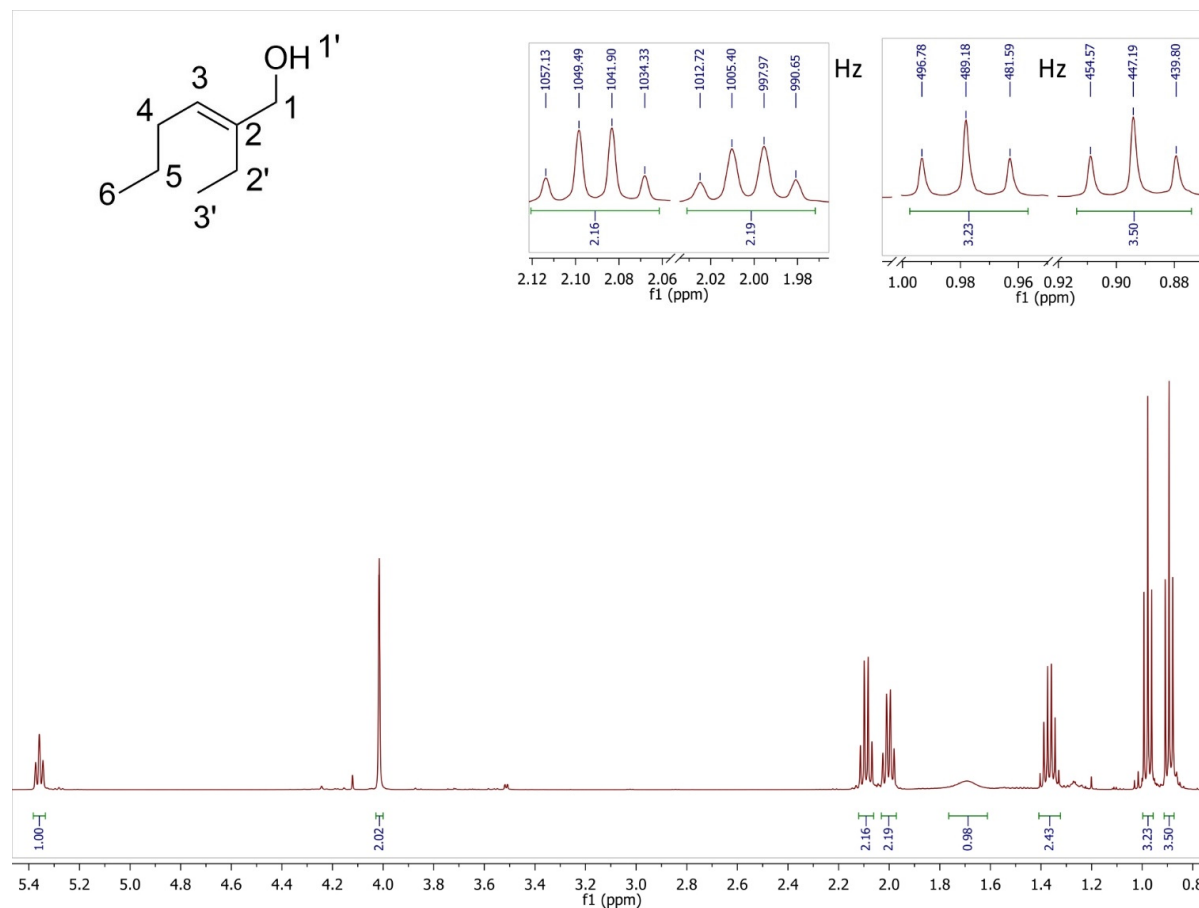
Synthese von 2-Ethyl-2-hexenol aus 2-Ethyl-2-hexenal (AAV. 29, Extraktion mit DEE).

**Ansatz:** 997 mg (7,9 mmol) 2-Ethyl-2-hexenal  
480 mg (11,9 mmol) NaBH<sub>4</sub>

**Ausbeute:** 94,7 % (960 mg, 7,49 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.89 (t, 3H,  $J$  (6,5) = 7.4 Hz, H-6), 0.98 (t, 3H,  $J$  (3',2') = 7.6 Hz, H-3'), 1.37 (dt, 2H, H-5), 1.69 (bs, 1H, H-1'), 2.00 (q, 2H, H-4), 2.09 (q, 2H, H-2'), 4.02 (s, 2H, H-1), 5.36 (1H,  $J$  = 7.2 Hz, H-3)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 13.34 (C-6), 13.96 (C-3'), 21.14 (C-5), 23.02 (C-4), 29.50 (C-2'), 66.93 (C-1), 126.37 (C-3), 140.83 (C-2)



**Abb. 156.** NMR-Spektrum von 2-Ethyl-2-hexenol

### 5.7.19. Synthese von (*E*)-(1-Methoxy-1-methylethoxy)-2-methyl-pent-2-en

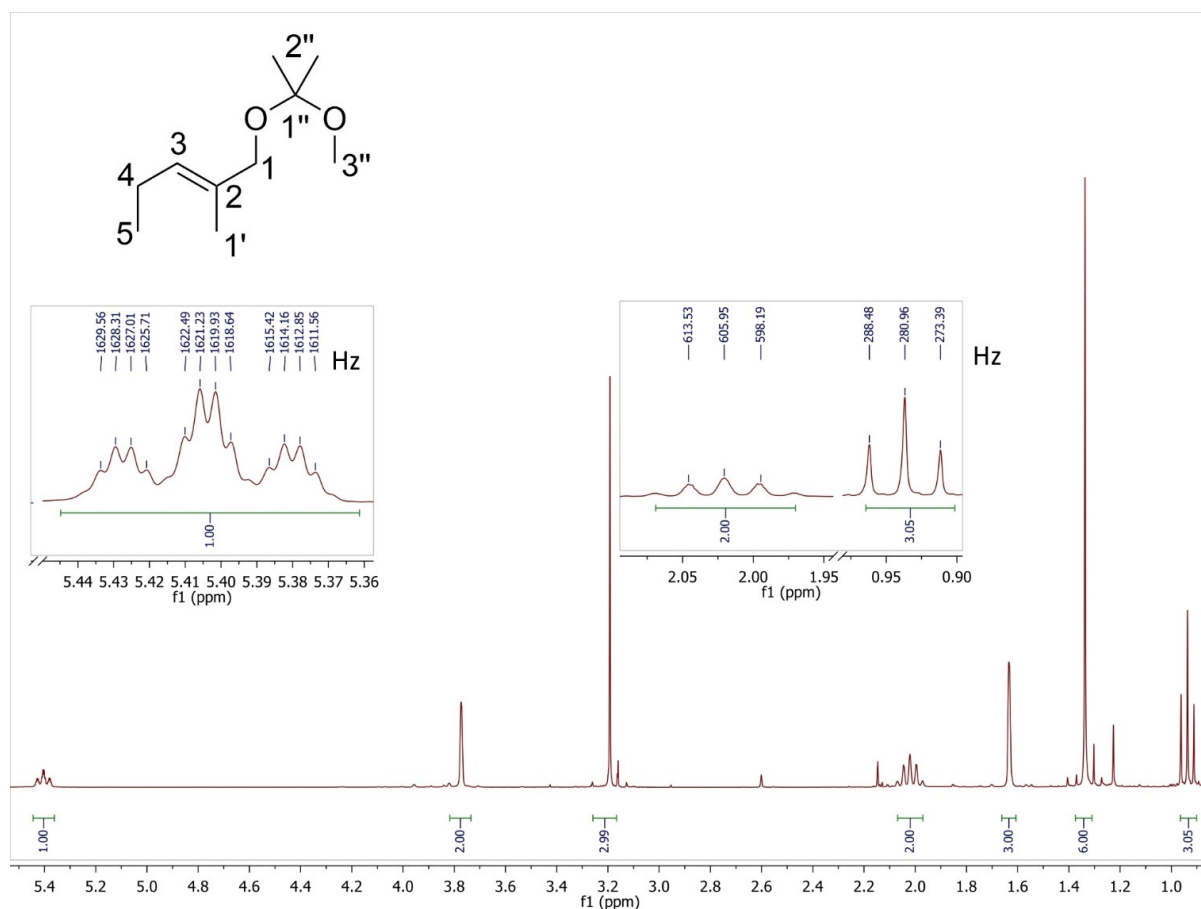
Synthese von (*E*)-(1-Methoxy-1-methylethoxy)-2-methyl-pent-2-en aus 2-Methyl-2-pentanol durch (AAV. 29) und Schützung (AAV. 31, Reaktionszeit 20 h, Extraktion mit Diethylether).

**Ansatz:** 503 mg (5,02 mmol) 2-Methyl-2-pentanol

**Ausbeute:** 87,8 % (760 mg, 4,41 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.94 (t, 3H, H-5), 1.34 (s, 6H, H-2''), 1.63 (s, 3H, H-1'), 2.02 (m, 2H, H-4), 3.19 (s, 3H, H-3''), 3.77 (s, 2H, H-1), 5.40 (dt, H-3)

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 14.10 (C-5), 14.18 (C-1'), 21.08 (C-4), 24.65 (C-2''), 48.65 (C-3''), 67.04 (C-1), 100.14 (C-1''), 129.12 (C-3), 131.90 (C-2)



**Abb. 157.** NMR-Spektrum von (*E*)-(1-Methoxy-1-methylethoxy)-2-methyl-pent-2-en



### 5.7.20. Synthese von (*E*)-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-ethyl-hex-2-en

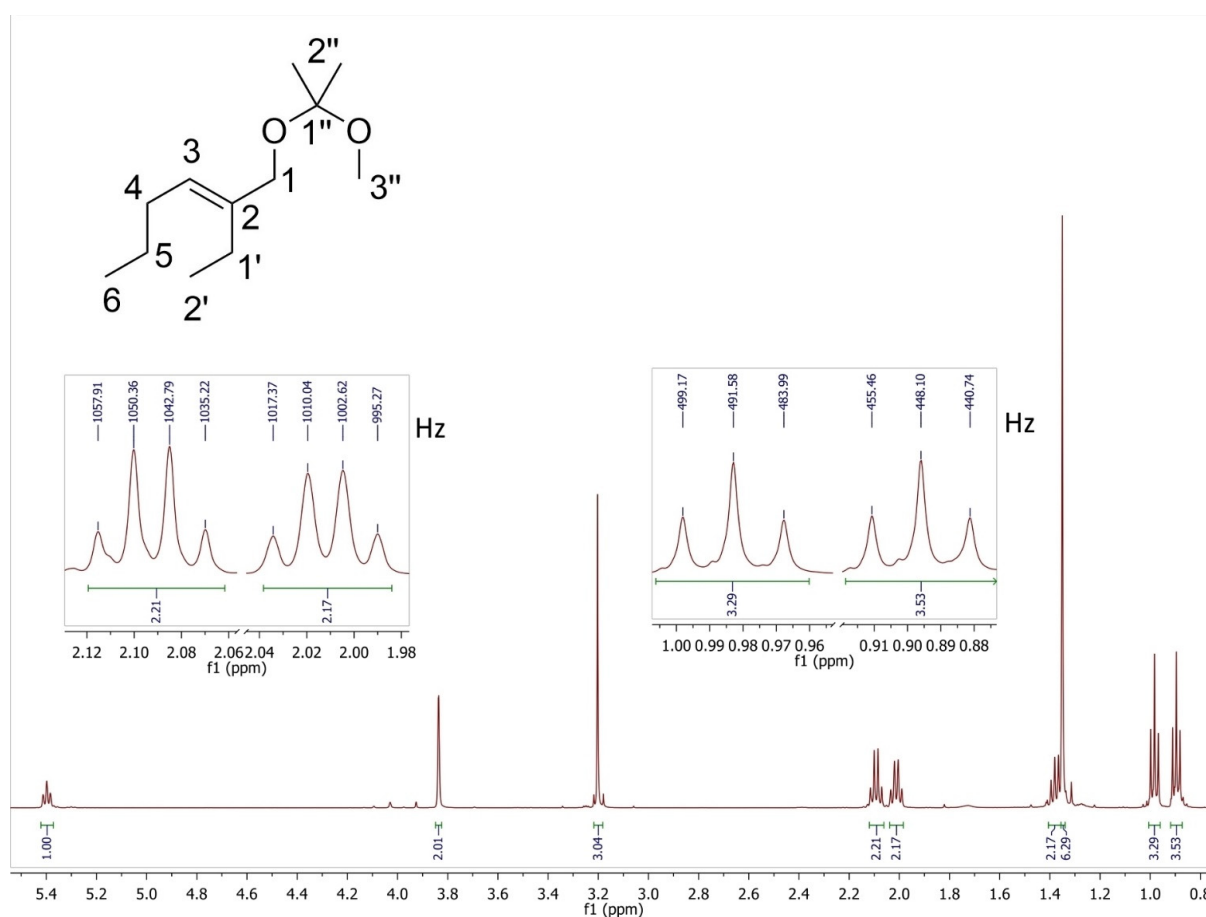
Synthese von (*E*)-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-ethyl-hex-2-en aus 2-Ethyl-2-hexenol durch Reduktion (AAV. 29) und Schützung (AAV. 31, Extraktion erfolgte mit DEE, 20 h Reaktionszeit).

**Ansatz:** 509 mg (3,97 mmol) 2-Ethyl-2-hexenol

**Ausbeute:** 61,46 % (490 mg, 2,44 mmol)

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 0.89 (t, 3H,  $J$  (6,5) = 7.4 Hz, H-6), 0.98 (t, 3H,  $J$  (2',1') = 7.6 Hz, H-2'), 1.35 (s, 6H, H-2''), 1.37 (tq, 2H,  $J$  (5,4) = 7.4 Hz, H-5), 2.01 (td, 2H, H-4), 2.09 (q, 2H, H-1'), 3.20 (s, 3H, H-3''), 3.84 (s, 2H, H-1), 5.39 (t, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, H-3)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 13.38 (C-2'), 14.03 (C-6), 21.55 (C-1'), 23.02 (C-5), 24.65 (C-2''), 29.63 (C-4), 48.62 (C-3''), 64.78 (C-1), 127.01 (C-3), 138.42 (C-2), 100.16 (C-1'')



**Abb. 158.** NMR-Spektrum von (*E*)-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-ethyl-hex-2-en

**5.7.21. Synthese von (4*R*)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on in MTBE**

Im Reaktionsgefäß wurde aus MeOH/MTBE umkristallisiertes Acetoin (1,88 g, 21,33 mmol) in MTBE (über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, 100 ml) unter Rückfluss gelöst und mit Propanal (2,43 g, 41,83 mmol) und TEA-Puffer (1 ml, 1M, pH 7,5) versetzt. Nun wurden lyophilisierte BL21 (DE3)-Zellen (2,5 g enthalten 91,7 mg FSA A165G/T185A) hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit einem schwebenden Rührfisch für 24 h bei RT gerührt. Die Zellen wurden zentrifugiert (3087 g, 40 Min.). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und das verbliebende Öl 1,5 h lang bei 13 mbar getrocknet. Der braune kristalline Rückstand wurde zur NMR-Analyse verwendet (Abb. 159.).

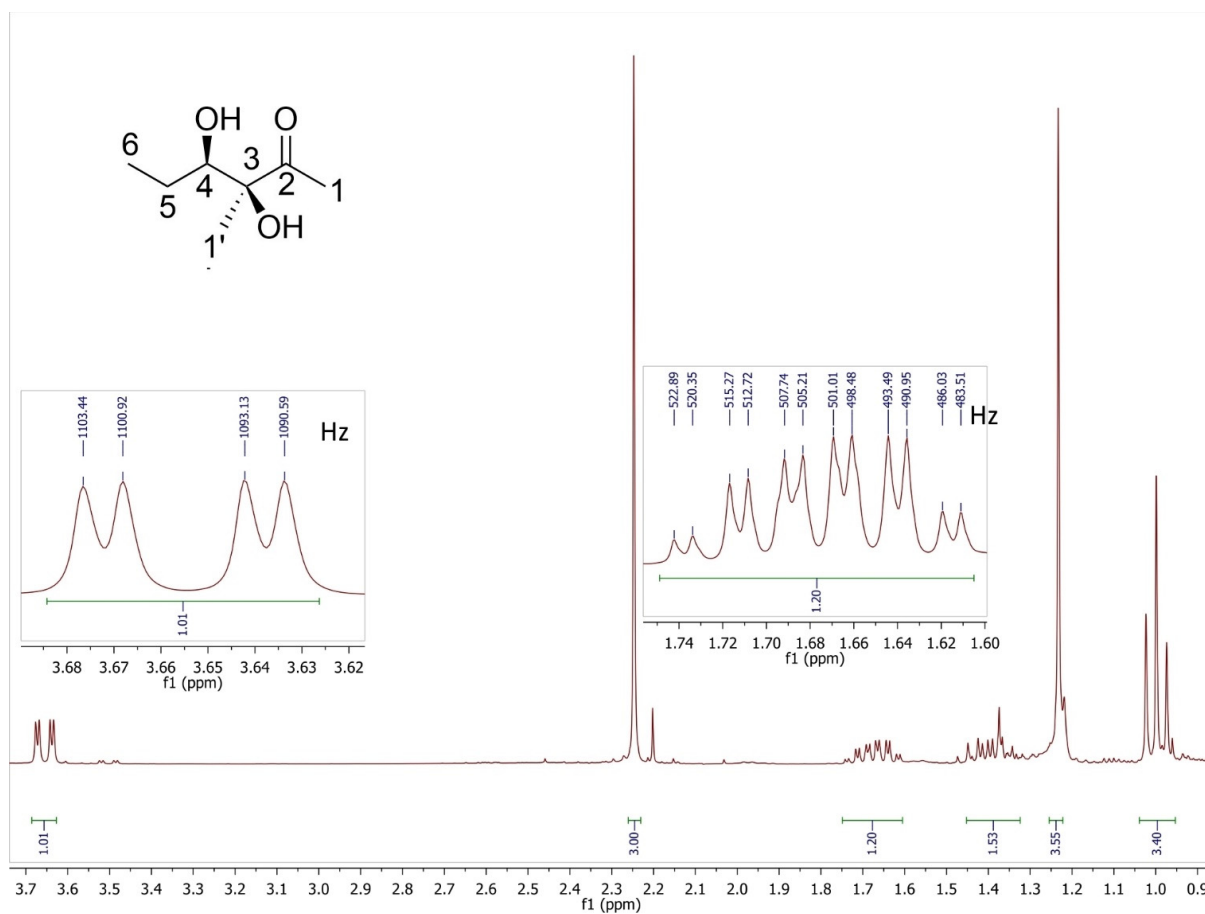
**Ansatz:** 1,88 g (21,33 mmol) Acetoin  
2,43 g (41,83 mmol) Propanal

**Ausbeute:** 18.61 % (580 mg, 3,97 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 1.01 (t, 3H,  $J$  = 7.4 Hz, H-6), 1.24 (s, 3H, H-1'), 1.41 (m, 1H, H-5a), 1.69 (dqm, 1H,  $J$  = 7.5; 10.1; 2.5 Hz, H-5b), 2.26 (s, 3H, H-1), 3.66 (dd, 1H,  $J$  = 10.3  $J$  = 2.4 Hz, H-4)

**<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 10.55 (C-6), 21.61 (C-1'), 23.64 (C-1), 24.02 (C-5), 76.61 (C-4), 81.39 (C-3), 211.97 (C-2).

---



**Abb. 159.** NMR-Spektrum von (4R)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on

### 5.7.22. Synthese von, 1,5,6-Trideoxy-3-C-methyl-3,4-O-(1-methylethyliden)-D-threo-2-hexulose

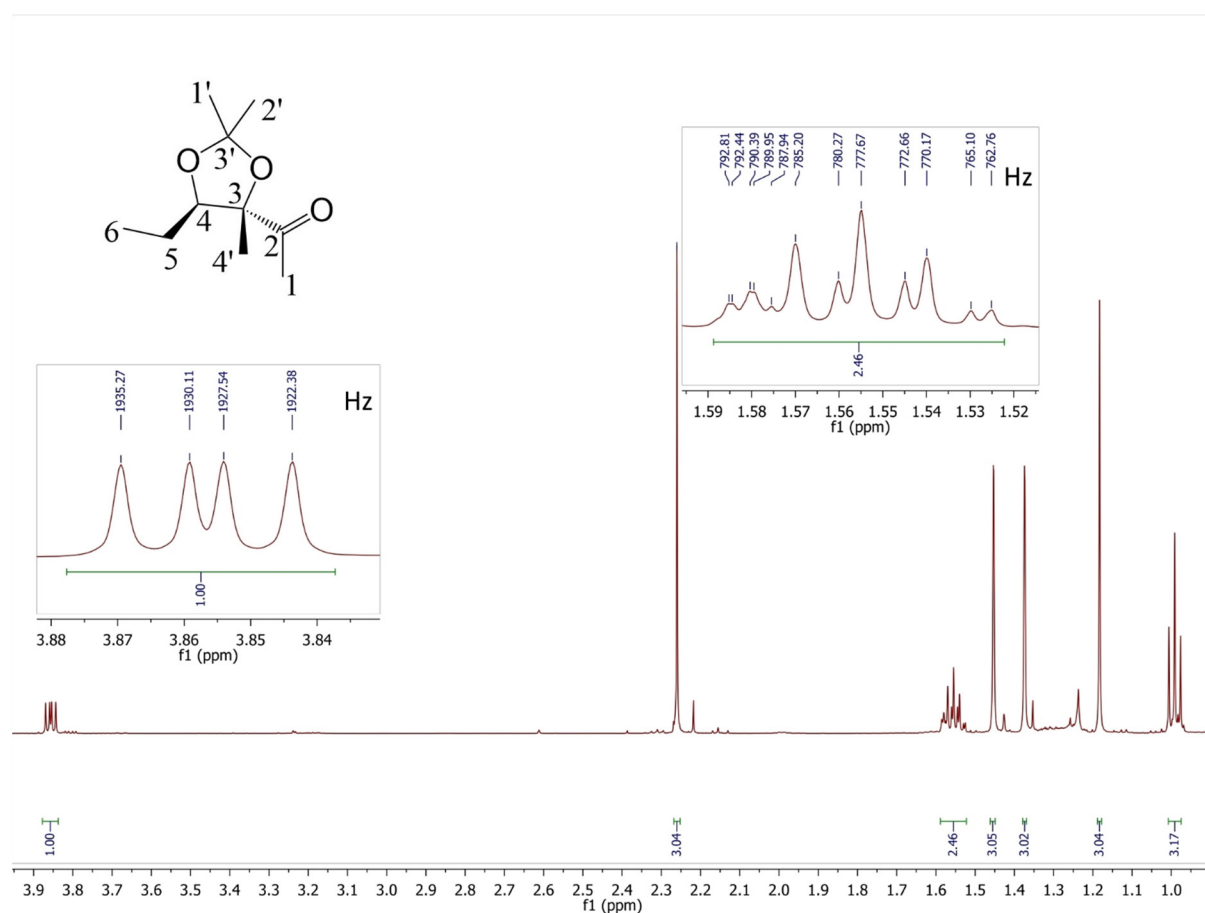
Synthese von 1,5,6-Trideoxy-3-C-methyl-3,4-O-(1-methylethyliden)-D-threo-2-hexulose aus (4*R*)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on (AAV. 31)

**Ansatz:** 580 mg (3,97 mmol) (4*R*)-3,4-Dihydroxy-3-methylhexan-2-on

**Ausbeute:** 32 % (236 mg, 1,27 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.99 (t, 3H,  $J$  = 7.5 Hz, H-6), 1.18 (s, 3H, H-4'), 1.37 (s, 3H, H-1'), 1.45 (s, 3H, H-2'), 1.56 (m,  $J$  = 7.5, 5.1 Hz, 2H, H-5), 2.26 (s, 3H, H-1), 3.86 (dd, 1H,  $J$  = 7.7, 5.2 Hz, H-4)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 11.35 (C-6), 18.94 (C-4'), 22.75 (C-5), 25.58 (C-1), 26.08 (C-1'), 28.56 (C-2'), 80.46 (C-4), 87.50 (C-3), 108.52 (3'), 211.81 (C-2)



**Abb. 160.** NMR-Spektrum von 1,5,6-Trideoxy-3-C-methyl-3,4-O-(1-methylethyliden)-D-threo-2-hexulose

### 5.7.23. Synthese von 4,4-Dimethoxybutan-2-ol

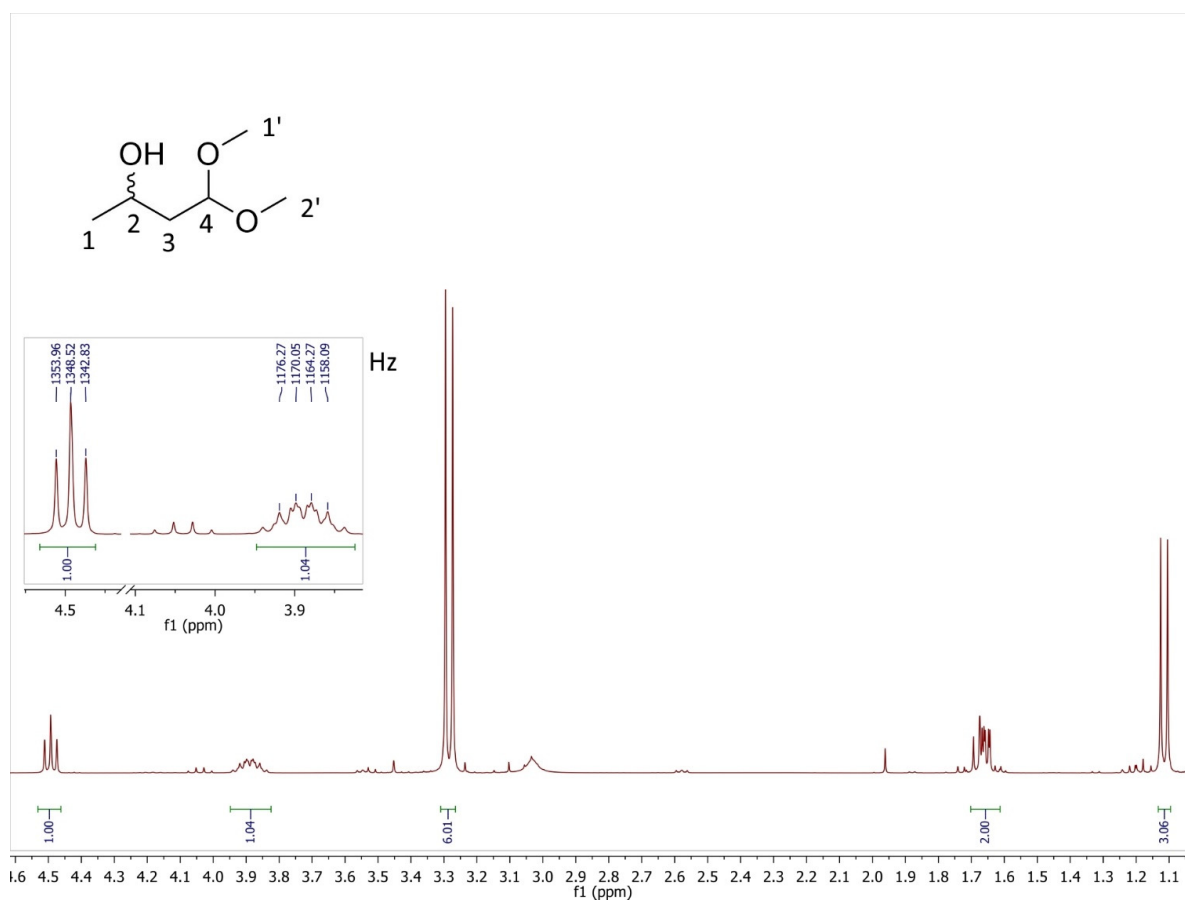
In einem Reaktionsgefäß wurde trocknes MeOH (50 ml) vorgelegt mit 4,4-Dimethoxybutan-2-on (3,44 g, 26 mmol) versetzt und mittels Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung wurde portionsweise unter Rühren NaBH<sub>4</sub> (500 mg, 13 mmol) hinzugegeben. Nach 20 Min. wurde dieselbe Menge NaBH<sub>4</sub> (500 mg, 13 mmol) hinzugegeben. Nach 30 Min. wurde das Eisbad entfernt, es wurde für weitere 90 Min. gerührt<sup>[129]</sup>. Das Reaktionsgemisch wurde mit TEA-Puffer (50 mM, 25 ml, pH 8,6) versetzt und für 2 h gerührt. Das MeOH wurde evaporiert, die wässrige Lösung mit Ethylacetat (3 x 15 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Es wurde ein NMR angefertigt (Abb. 161.).

**Ansatz:** 3,44 g (26 mmol) 4,4-Dimethoxybutan-2-on

**Ausbeute:** 76% (2,66 g, 19,83 mmol)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 1.12 (d, 3H,  $J$  = 6.3 Hz, H-1), 1.6–1.73 (m, 2H, H-3), 1.27 (s, 3H, H-1'), 3.29 (s, 3H, H-2'), 3.89 (m,  $J$  = 7.6, 6.2, 4.2 Hz, 1H, H-2), 4.49 (t, 1H,  $J$  = 5.6 Hz, H-4)

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 23.44 (C-1), 41.12 (C-3), 52.87 (C-1'), 53.60 (C-2'), 64.50 (C-2), 103.76 (C-4)



**Abb. 161.** NMR-Spektrum von 4,4-Dimethoxybutan-2-ol

### 5.7.24. Synthese von (S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol mittels *Saccharomyces cerevisiae*

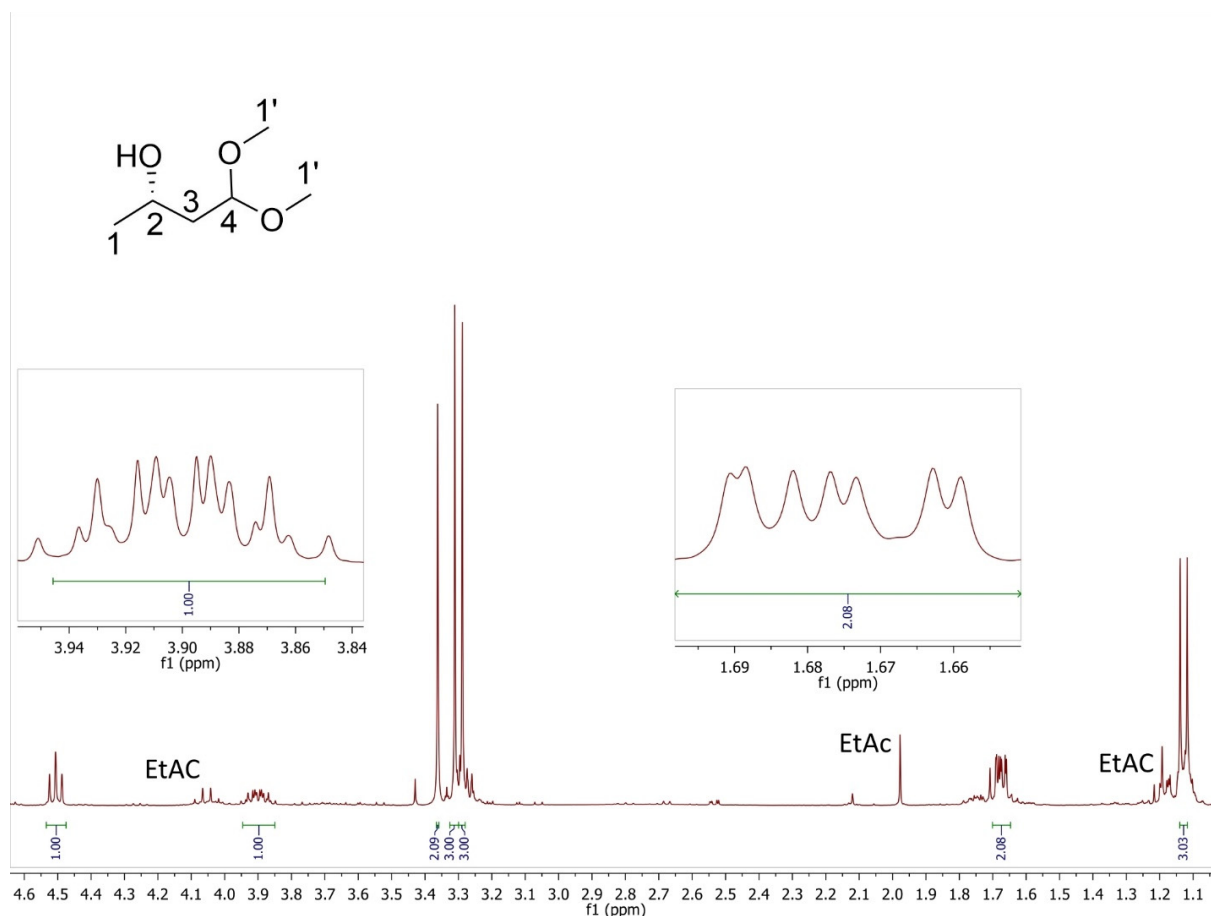
In einem Schikanekolben (1 l) wurde Saccharose (40 g) in Leitungswasser (400 ml) gelöst. Nun wurde *Saccharomyces cerevisiae* (42 g aus dem Supermarkt) und  $\text{CaCO}_3$  (3 g) im Kolben suspendiert. Es wurden Antischaumemulsion (300  $\mu\text{l}$ ) und 4,4-Dimethoxybutan-2-on (3,98 g, 30,14 mmol) hinzugegeben. Der Kolben wurde bei 30 °C inkubiert (210 rpm, 28,5 h). Nach 16 h und 21 h wurde noch einmal Saccharose hinzugegeben (6 g und 4,45 g). Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (12860 g, 10 Min.) und der Überstand mit Ethylacetat (4 x 200 ml) extrahiert. Dabei entstehende schaumige Mischphasen wurden unter Unterdruck teilweise entmischt. Die organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der ölige Rückstand wurde erneut zentrifugiert (16000 g, 1 Min.) und der Überstand per NMR analysiert (Abb. 162.).

**Ansatz:** 3,98 (30,14 mmol) 4,4-Dimethoxybutan-2-on

**Ausbeute:** 24,66 % (durch Integration bestimmt, 1,72 g, 12,82 mmol)

**$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 1.13 (d, 3H,  $J$  = 6.3 Hz, H-1), 1.68 (m, 2H, H-3), 3.28 (s, 3H, H-1'), 3.31 (s, 3H, H-2'), 3.90 (m,  $J$  = 7.8, 6.2, 4.3 Hz, 1H, H-2), 4.51 (t, 1H,  $J$  = 5.5 Hz, H-4)

**$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 23.32 (C-1), 41.02 (C-3), 52.93 (C-1'), 53.70 (C-1'), 66.48 (C-2), 103.79 (C-4)



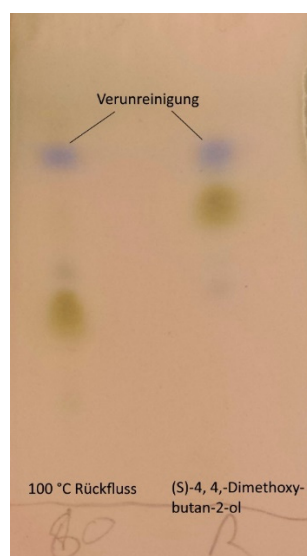
**Abb. 162.** NMR-Spektrum von (S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol

### 5.7.25. Synthese von (*S*)-3-Hydroxybutanal mittels HCl

In einem Rundkolben wurde (*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol (3 ml, 22,6 mmol) in TEA Puffer (30 ml, 50 mM) gelöst und der pH-Wert auf 2,0 eingestellt. Nach ca. 4 h wurde die Reaktion dünnschichtchromatographisch analysiert. Es sind diverse Produkte entstanden.

### 5.7.26. Herstellung von (*S*)-3-Hydroxybutanal mittels heißem Wasser

In einem Rundkolben wurde VE-Wasser mit (*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol gemischt (192 mM) und über mehrere Stunden im Rückfluss erhitzt <sup>[130,130]</sup>. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (Abb. 163.).



**Abb. 163.** Dünnschichtchromatographische Analyse der Entschüttung von (*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol in kochendem Wasser. Laufmittel war  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 10:1, Anfärbung mit Anisaldehyd-Lösung

### 5.7.27. Darstellung von 3,5-Dihydroxy-2,4-dimethylheptanal mittels FSA D6A/T26L

In einem Reaktionsgefäß wurde TEA-Puffer (500 ml, 50 mM, pH 7,0) vorgelegt und mit DTT (2 mM) und Propanal (8,1 g, 139 mM) versetzt. Nun wurde FSA D6A/T26L (190 mg FSA) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 5 Tage bei RT gerührt. Das Enzym wurde nach AAV. 28 entfernt. Es erfolgte eine Extraktion mit EtOAc (6 x 200 ml). Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und evaporiert. Die Rohausbeute betrug 4,85 g (59,9%). Es ist jedoch laut dünnschichtchromatographischer Analyse nur (*R*)-4-Hydroxyhexan-2-on entstanden, kein 3,5-Dihydroxy-2,4-dimethylheptanal.

#### **5.7.28. Synthese von Sitophilure mittels FSA-Varianten aus 3-Pentanon und Propanal**

Lyophilisierte FSA D6A/L163A Zellen (AAV. 6, ca. 170 mg FSA) wurden nach AAV. 27 in DEE mit 3-Pentanon (16,2 g, 188 mM) und Propanal (4,06 g, 70 mM) versetzt. Nach 5 Tagen wurde das Produkt per NMR analysiert. Der Versuch wurde mit FSA D6H/A165G wiederholt. Das NMR war stark verunreinigt, kleinere C13 Signale konnten Sitophilure zugeordnet werden. Aufgrund der vielfältigen Verunreinigung ist lediglich nicht auszuschließen, dass Sitophilure entstanden ist.

---



## 5.8. Gaschromatographische Analyse

### 5.8.1. Allgemeine Arbeitsanweisungen

Alle GC-Analysen wurden im *Split Mode* durchgeführt.

#### AAV. 35 Enzymreaktionen für GC-Untersuchungen

Ein *Eppendorf*-Gefäß (2 ml) wurde mit LB-Medium befüllt (1,6 ml), mit einem Loch im Deckel (ca. 3 mm) versehen und für 16-18 h mit dem - das gewünschte Plasmid enthaltenden Bakterien- aus einem Glycerolstock inokuliert (37 °C, 900 *rpm*). Anschließend wurde das Gefäß zentrifugiert (16000 g, 30 Sek.) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in IPTG-haltigem LB-Medium resuspendiert (1,6 ml) und für 6 h inkubiert (37 °C, 900 *rpm*). Nun wurde erneut zentrifugiert (16000 g, 30 Sek.). Das Pellet (ca. 50 µg FSA) wurde in TEA-Puffer (500 µl, 50 mM, pH 8,3) resuspendiert, mit den entsprechenden Substraten vermischt und bei RT inkubiert (900 *rpm*).

#### AAV. 36 GC-Analyse von Reaktionen

Eine Probe (100 µl) der zu analysierenden Reaktion wurde entnommen und mit MeOH (900 µl) vermischt. Nach ca. 5 Min. wurde diese zentrifugiert (16000 g, 2 Min.) und der Überstand in ein Schraubgefäß (2 ml) überführt. Aus diesem wurde mittels *Autosampler* eine Probe in die GC injiziert und analysiert.

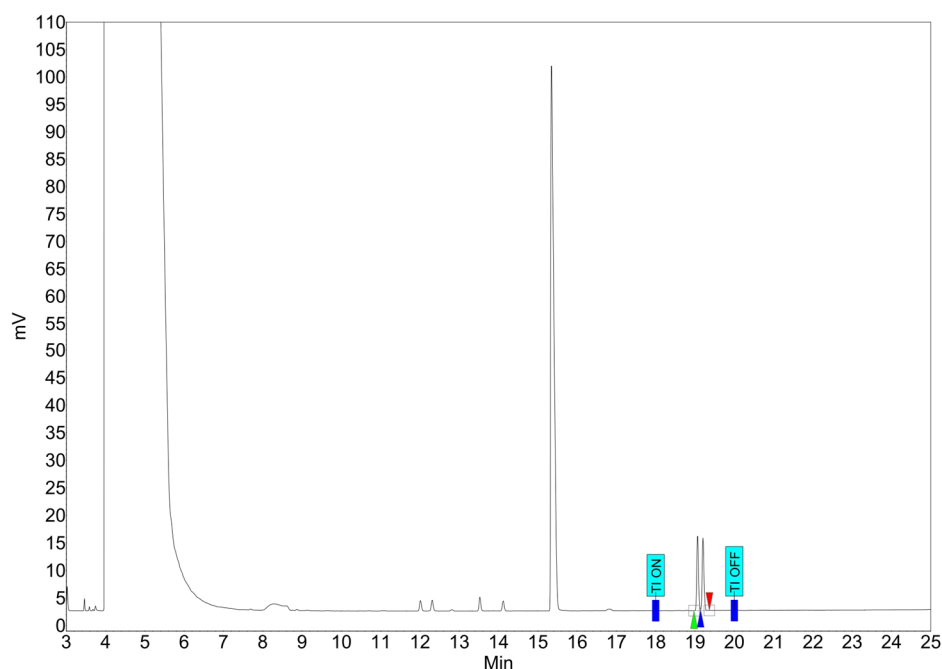
---

### 5.8.2. Enantioselektivität von durch FSA D6E hergestelltem 4-Hydroxyhexan-2-on

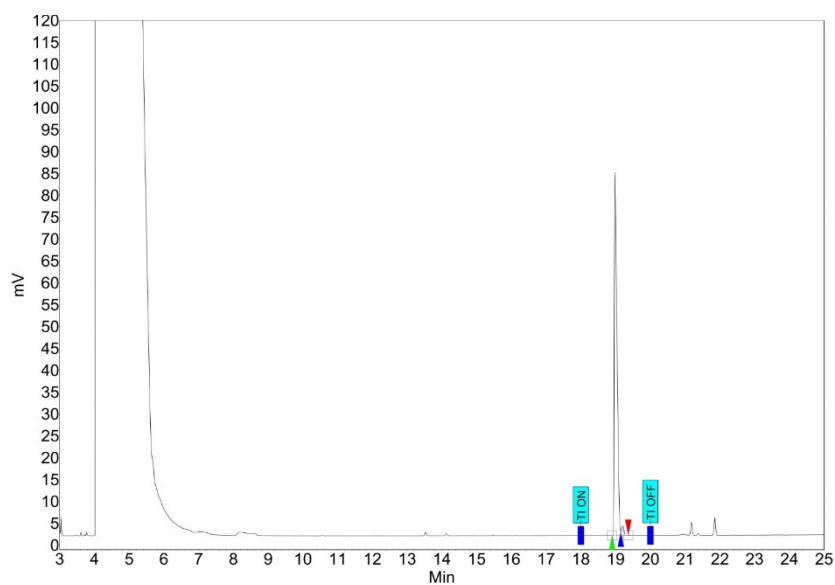
Die in 5.7.9 erhaltene Mischung aus 4-Hydroxyhexan-2-on und 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on sowie die in 5.7.3 erhaltene Substanz (*R*)-4-Hydroxyhexan-2-on und die in 5.7.4 erhaltene Substanz (*R*)-4-Hydroxyheptan-2-on wurde jeweils in EtOH gelöst (ca. 86 mM) und mittels chiraler GC analysiert (Abb. 164., Abb. 165., Tabelle 35.).

**Tabelle 35.** Parameter der GC für die Untersuchung von 4-Hydroxyhexan-2-on

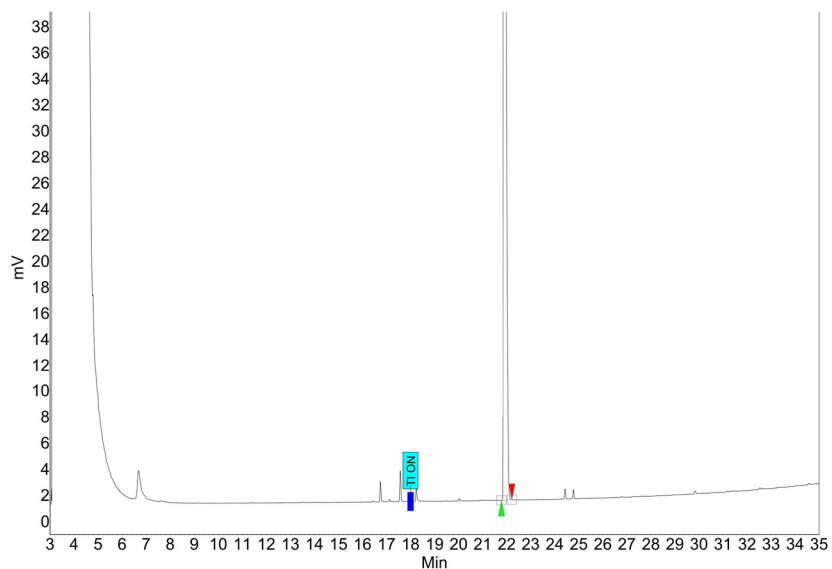
Parameter:	
Injektor-Temperaturen:	230 °C
Detektor-Temperaturen:	230 °C
Starttemperatur:	80 °C
Endtemperatur:	230 °C
Anfangswartezeit	0 Min.
Temperaturgradient:	4 °C/Min.
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Säule:	Rt- $\beta$ DEXsa™ von Restek 0.25mm x 30m
GC-Gerät:	GC 8000 Series FISIONS Instrument
Trärgas:	Stickstoff



**Abb. 164.** GC-Analyse von racemischen 4-Hydroxyhexan-2-on (*Rt*: 19 Min.) und 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on (*Rt*: 15,4 Min.)



**Abb. 165.** GC-Analyse von (R)-4-Hydroxyhexan-2-on (*Rt*: 19 Min.)



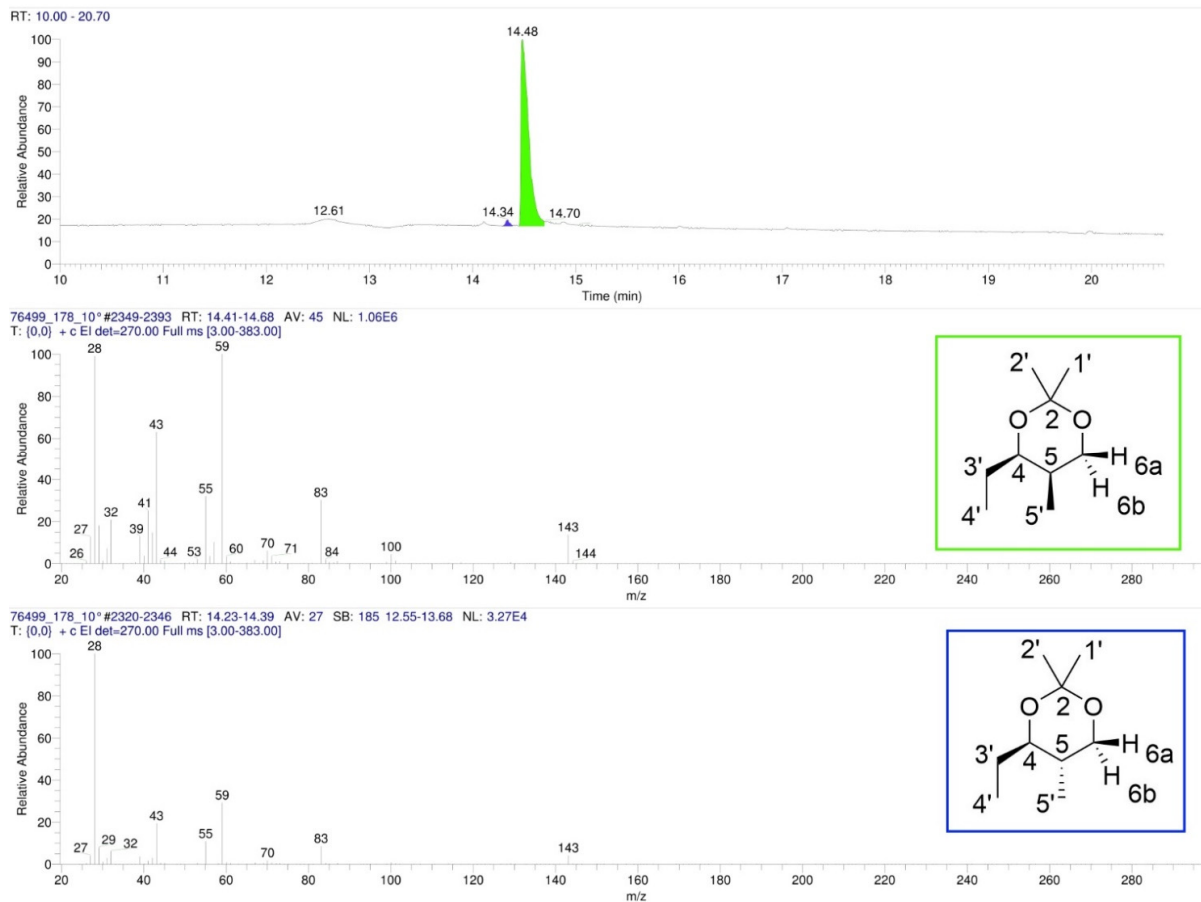
RTbeta dex cst-1m Programm 60°C 3 K/min 230°C 5 min Inj/Det/: 230°C

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [mV]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	21.867	100.00	93.7	10.8	100.000
Total			100.00	93.7	10.8	100.000

**Abb. 166.** GC-Analyse von (R)-4-Hydroxyheptan-2-on (*Rt*: 22 Min.)

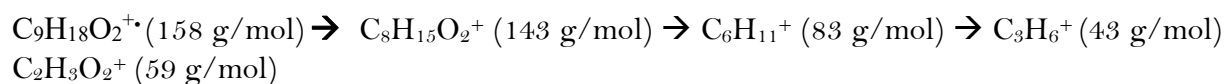
### 5.8.3. GC-MS-Analyse (EI) von (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan

Das in 5.7.13 hergestellte (4*R*,5*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan wurde mittels chiraler GC-MS untersucht (Abb. 167.).



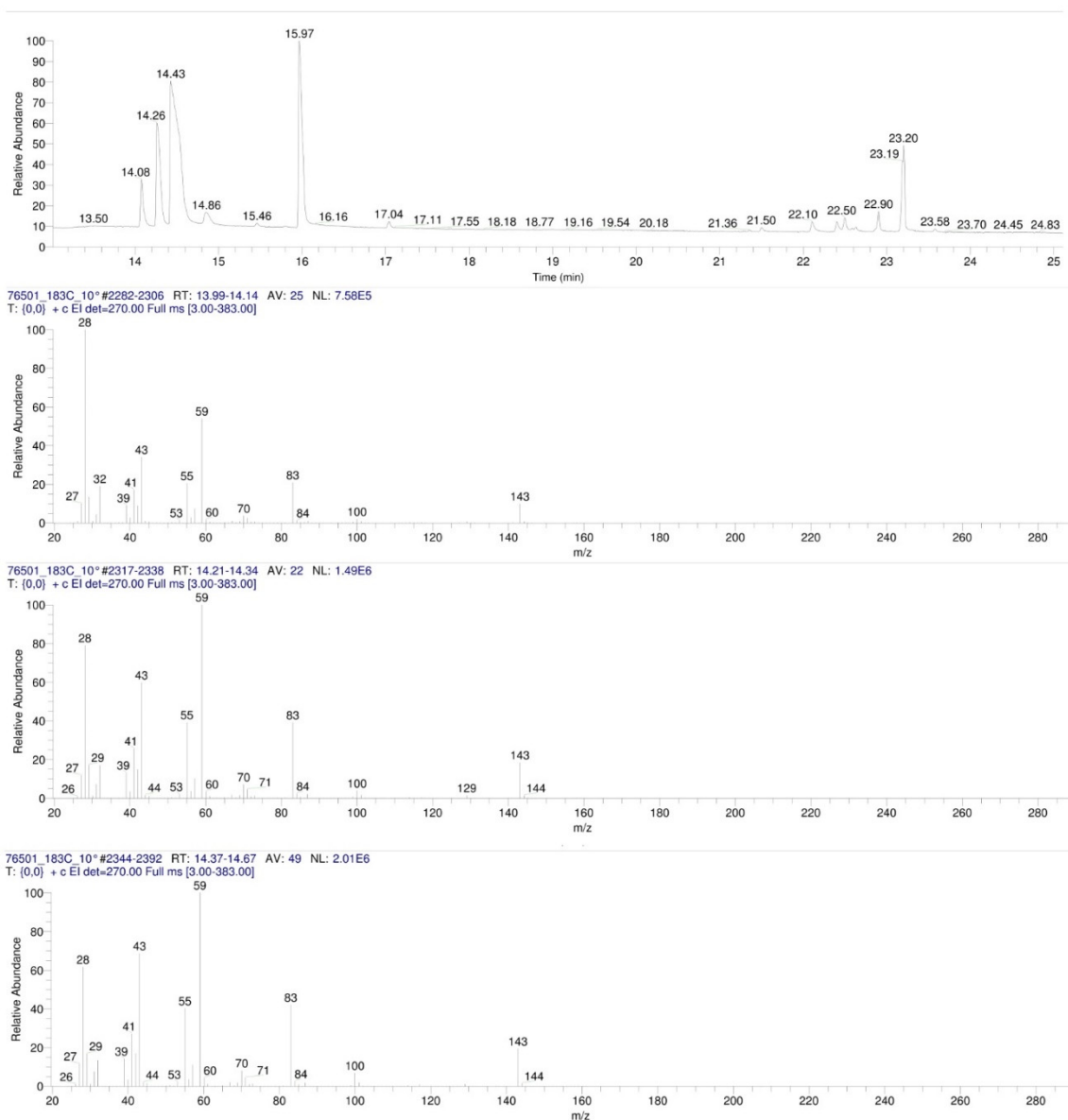
**Abb. 167.** GC-Analyse und MS-Zerfallsmuster von mit FSA D6A/T26I-hergestelltem 4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan

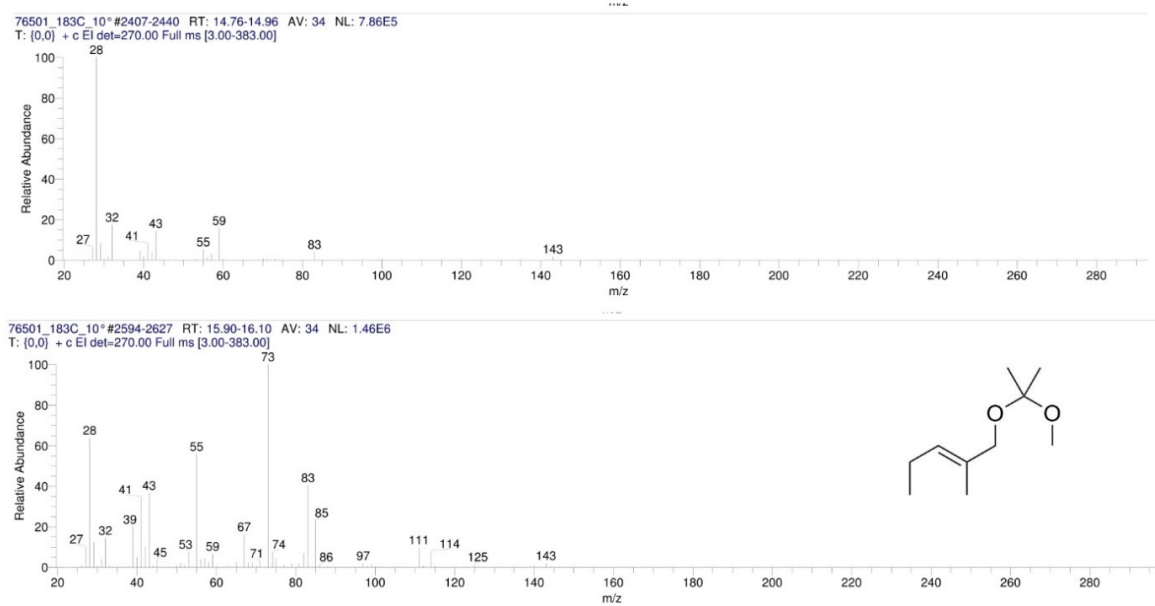
Zerfallsmuster:



### 5.8.4. GC-MS-Analyse (EI) von (4*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan

Das in 5.7.15 hergestellte (4*R*)-4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan wurde mittels chiraler GC-MS untersucht (Abb. 168.).

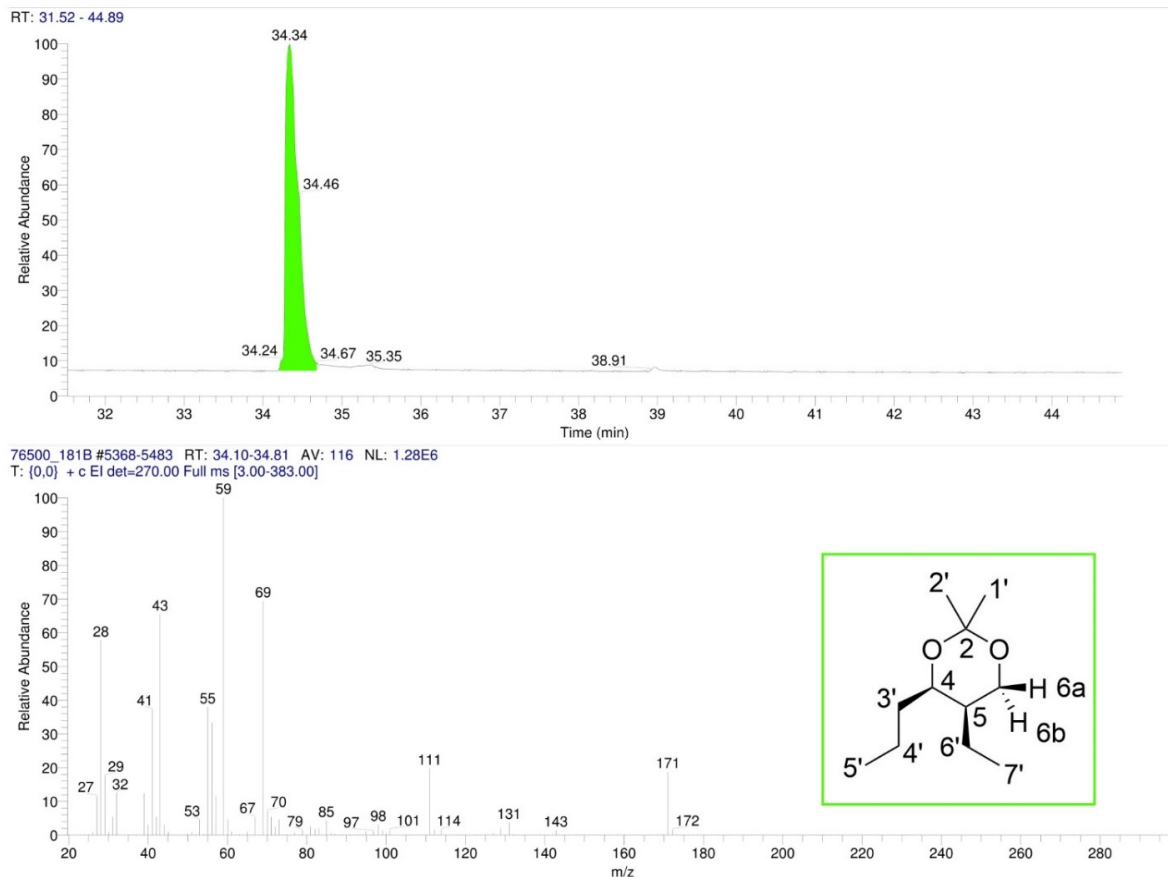




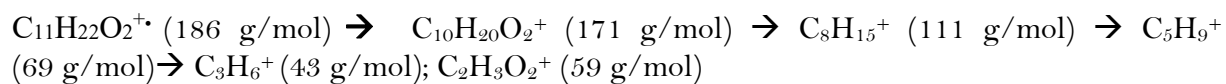
**Abb. 168.** GC-Analyse und MS-Zerfallsmuster von 4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan und (*E*)-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-methyl-pent-2-en

### 5.8.5. GC-Analyse (EI) von (4*R*,5*R*)-5-Ethyl-2,2- dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

Das in 5.7.145.7.15 hergestellte (4*R*,5*R*)-5-Ethyl-2,2- dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan wurde mittels chiraler GC-MS untersucht (Abb. 169.).

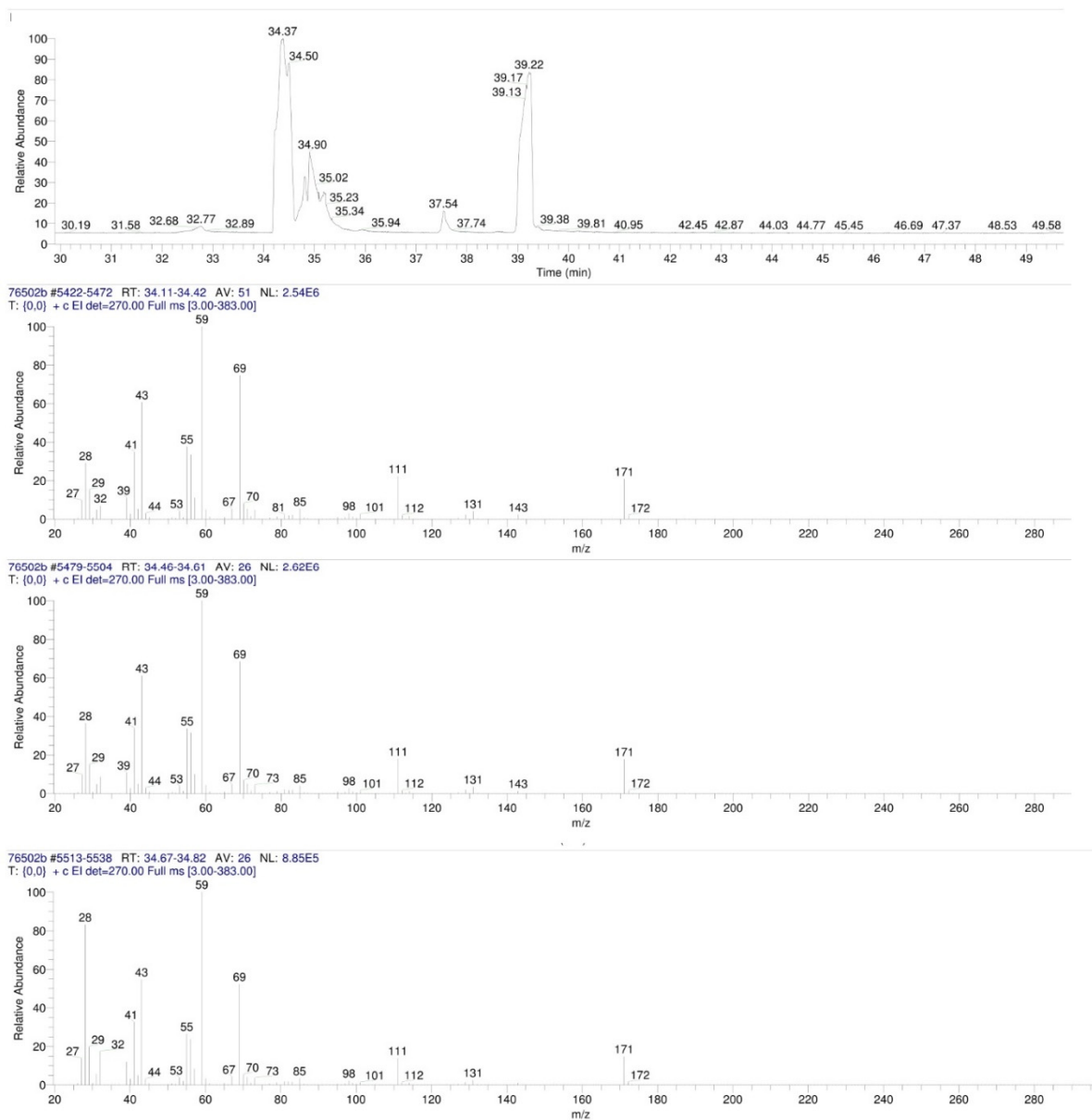


**Abb. 169.** GC-Analyse und MS-Zerfallsmuster von (4*R*,5*R*)-5-Ethyl-2,2- dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

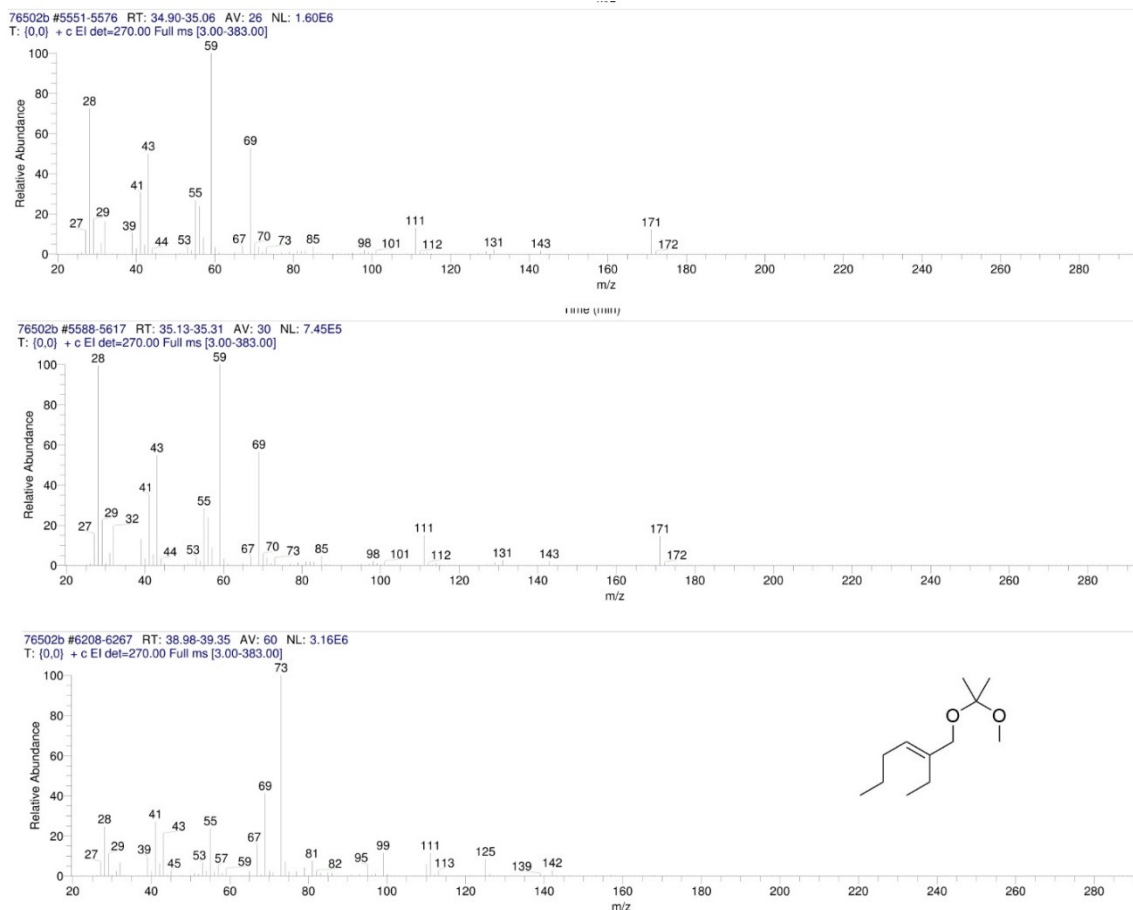


### 5.8.6. GC-MS-Analyse (EI) von (4R)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan

Das in 5.7.165.7.15 hergestellte (4R)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan wurde mittels chiraler GC-MS untersucht (Abb. 170.).







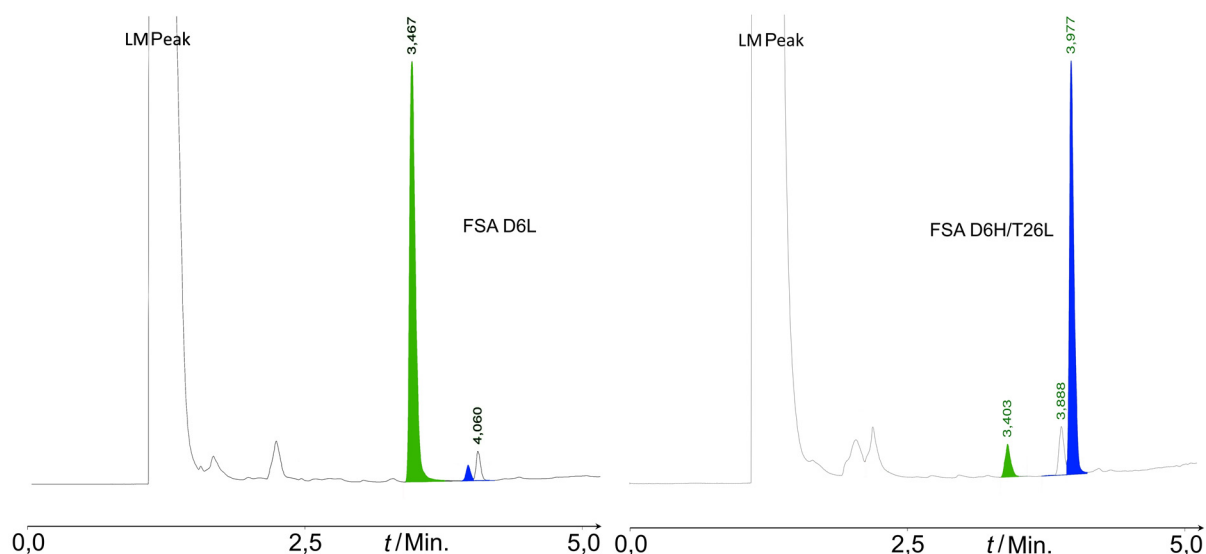
**Abb. 170.** GC-Analyse und MS-Zerfallsmuster von (4R)-5-Ethyl-2,2-dimethyl-4-propyl-1,3-dioxan mit (*E*)-(1-methoxy-1-methylethoxy)-2-ethyl-hex-2-en

### 5.8.7. Quantitative GC-Analyse der Spezifität der selektivsten FSA D6X/T26X-Varianten für Aceton und Propanal

Die FSA D6X/T26X-Varianten, welche bei dem dünnsschichtchromatographischen Screening (5.6.5) nur einen Hauptproduktspot gebildet hatten, wurden nach AAV. 35 exprimiert, mit Aceton (645 mM) und Propanal (40 mM) versetzt und nach AAV. 36 analysiert (Abb. 171., Tabelle 36., Tabelle 37.).

**Tabelle 36.** GC-Parameter zur Analyse der Spezifität der selektivsten FSA D6X/T26X-Varianten für Aceton und Propanal

Parameter:	
Injektor-Temperaturen:	200 °C
Detektor-Temperaturen:	230 °C
Starttemperatur:	100 °C
Anfangswartezeit:	2 Min.
Endtemperatur:	200 °C
Temperaturgradient:	20 °C/Min.
Detektor:	Flammenionisationsdetektor



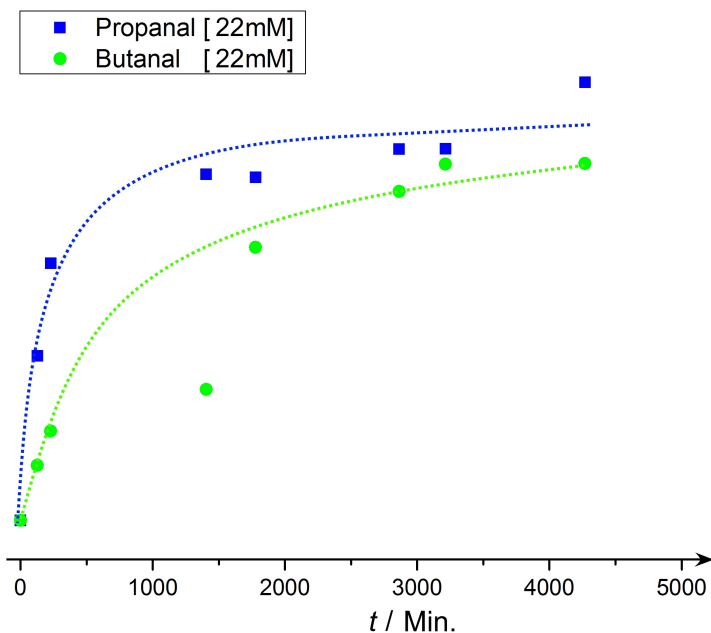
**Abb. 171.** Gaschromatographische Untersuchung der Produktbildung von FSA D6L und FSA D6H/T26L mit Aceton und Propanal als Substrat nach 1 h bei 37 °C. Der Peak für 4-Hydroxyhexan-2-on ist grün, der für 3-Hydrox-2-methylpentanal blau eingefärbt.

**Tabelle 37.** GC-Analyse verschiedener FSA-Varianten, **blau**= selektiv für 3-Hydrox-2-methylpentanal, **grün** = selektiv für 4-Hydroxyhexan-2-on.

FSA-Varianten	T <sub>R</sub> der GC Fläche in Min.		Selektivität	
	3,4	3,97		
	Integrals der Fläche	*10 <sup>3</sup>	Integral von 3,4/3,9	Integral von 3,9/3,4
<b>D6L</b>	510	27	<b>18,27</b>	0,05
<b>D6H</b>	229	7	<b>28,78</b>	0,03
<b>D6L/T26A</b>	198	11	<b>17,04</b>	0,06
D6L/T26V	75	14	5,12	0,20
<b>D6A/T26L</b>	45	376	0,12	<b>8,27</b>
D6A/T26V	46	335	0,14	7,15
D6E/T26L	79	335	0,24	4,21
T26L	64	257	0,25	3,98
<b>D6H/T26L</b>	23	234	0,10	<b>10,09</b>
D6P/T26I	30	212	0,14	7,03
D6E	191	200	0,95	1,05
<b>D6A/T26I</b>	15	181	0,09	<b>11,60</b>
<b>D6P/T26L</b>	14	158	0,09	<b>10,63</b>
D6A/T26A	21	158	0,13	7,52
D6V T26L	43	120	0,36	2,76
D6E/T26V	35	117	0,30	3,32
T26V	29	107	0,27	3,66
D6Q T26I	1	92	0	1,87
wt	23	14	1,66	0,60

### 5.8.8. Relative Synthesegeschwindigkeit von FSA D6A/T26L mit Propanal gegenüber Butanal

In einem Rundkolben wurde TEA-Puffer (200 ml, 50 mM, pH 7,4), DTT (2 mM) und FSA D6A/T26L (700 mg) gegeben. Die Lösung wurde auf zwei Rundkolben aufgeteilt (je 100 ml). Der eine wurde mit Butanal (1,6 g, 222 mM), der andere mit Propanal (1,3 g, 223 mM) versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 172.) wurde eine Probe entnommen und per GC analysiert (AAV. 36, Abb. 172.).



**Abb. 172.** Relative Reaktionsgeschwindigkeit von FSA D6A/T26L mit Propanal und Butanal als Substrat.

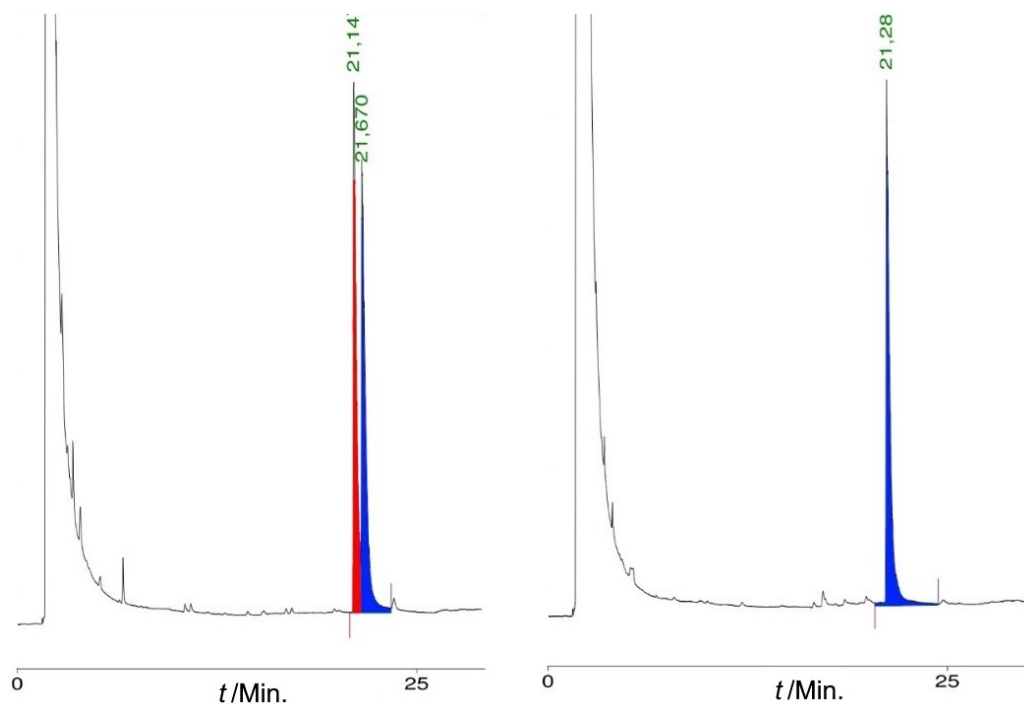
Daraus ergibt sich eine Reaktionsgeschwindigkeit von ca. 3,3 mU/mg für Propanal und 0,9 mU/mg für Butanal.

### 5.8.9. Enantiomerenreinheit von (*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol

Das in (7.7.28) hergestellte 4,4-Dimethoxybutan-2-ol und das in (7.7.29) hergestellte (2*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol wurde per GC analysiert (AAV. 36, Abb. 173, Tabelle 38.).

**Tabelle 38.** GC-Parameter für die Analyse von 4,4-Dimethoxybutan-2-ol

Parameter:	
Injektor-Temperaturen:	290 °C
Detektor-Temperaturen:	300 °C
Starttemperatur:	80 °C
Endtemperatur:	200 °C
Anfangswartezeit:	0 Min.
Temperaturgradient:	4 °C/Min. bis 120 °C, 1 °C/Min. bis 200 °C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Säule:	Rt-βDEXsa™ von Restek 0.25mm x 30m
GC-Gerät	GC-17A Gas-Chromatograph
Trärgas:	Stickstoff



**Abb. 173.** GC-Analyse von 4,4-Dimethoxybutan-2-ol und (2*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol

## 6. Anhang

### Vektorkarten

#### pET-16b

##### pET-16b sequence landmarks

T7 promoter	466-482
T7 transcription start	465
His-Tag coding sequence	360-389
Multiple cloning sites ( <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lacI</i> coding sequence	869-1948
pBR322 origin	3885
<i>bla</i> coding sequence	4646-5503

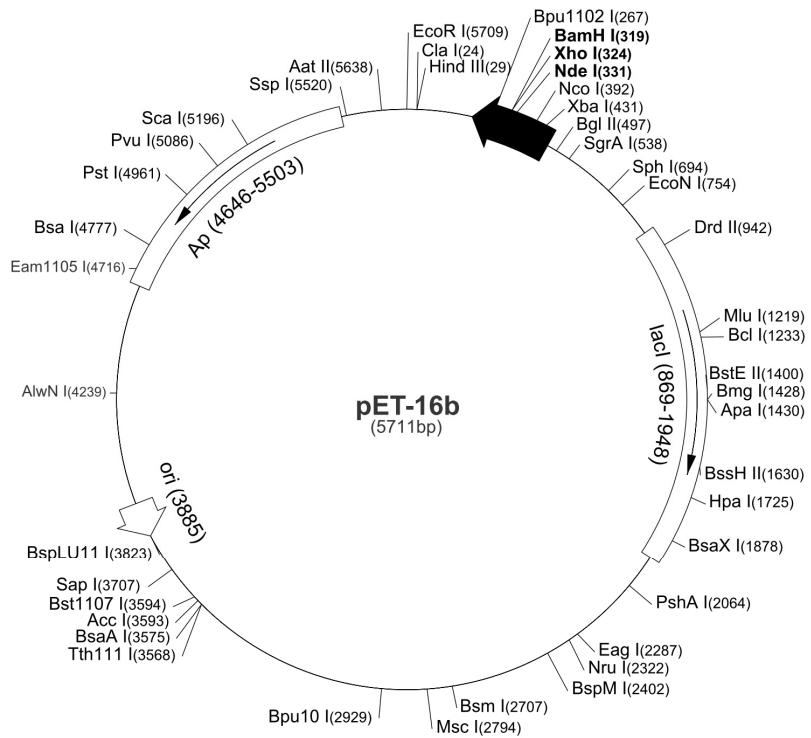


Abb. 174. Vektorkarte von pET-16b von Novagen<sup>[152]</sup>

## pQE-40

### pQE-40 Vector

#### Positions of elements in bases

Vector size	4031
Start of numbering at <i>Xho</i> I (CTCGAG)	1–6
T5 promoter/lac operator element	7–87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	127–144
Dehydrofolate reductase coding sequence	157–714
Multiple cloning site	721–762
Lambda $t_0$ transcriptional termination region	778–872
<i>rrnB</i> T1 transcriptional termination region	1634–1732
ColE1 origin of replication	2238
$\beta$ -lactamase coding sequence	3826–2966

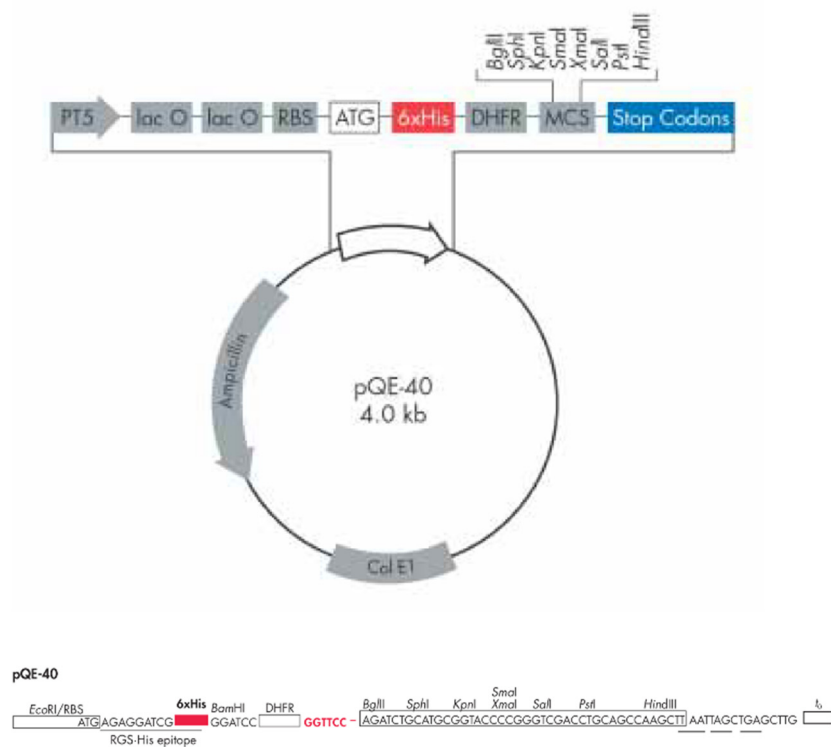
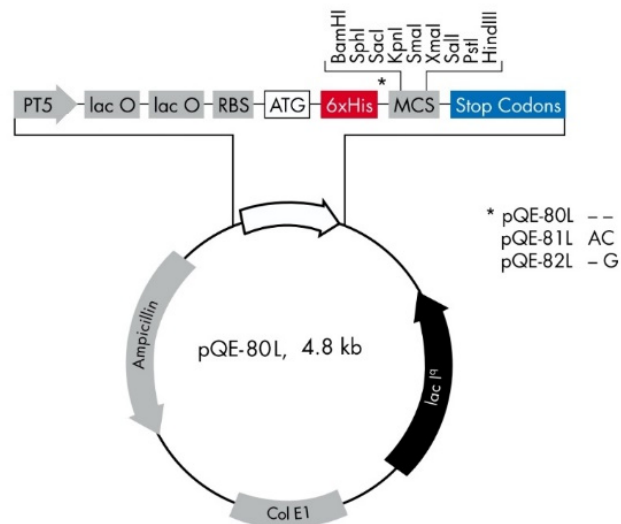


Abb. 175. Vektorkarte von pQE-40 von *Quiagen*<sup>[153]</sup>

## pQU-80-L

### pQE-80L, Vectors

Positions of elements in bases	pQE-80L
Vector size (bp)	4751
Start of numbering at <i>Xho</i> I (CTCGAG)	1–6
T5 promoter/lac operator element	7–87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	127–144
Multiple cloning site	145–192
Lambda $t_0$ transcriptional termination region	208–302
<i>rrnB</i> T1 transcriptional termination region	1064–1161
<i>lac</i> repressor coding sequence	2333–1252
ColE1 origin of replication	2928
$\beta$ -lactamase coding sequence	4546–3686



### pQE-80 L

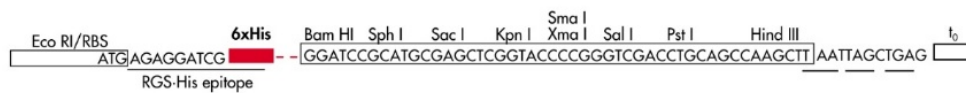


Abb. 176. Vektorkarte von pQU-89L von *Quiagen*



---

## 7. Literaturverzeichnis

---

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, G. J. Gatto, *Biochemie*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2014**.
  - [2] C. Thieme, "Sodium Carbonates" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2012**, pp. 301–317.
  - [3] H. Müller, "Sulfuric Acid and Sulfur Trioxide" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2012**, pp. 142–211.
  - [4] W. W. Hasenpfaß, *Mitt. - Ges. Dtsch. Chem., Fachgruppe Gesch. Chem.* **2005**.
  - [5] R. Iglesias *REACH: how to deal with 30,000 chemicals*, abrufbar unter: [www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/121107-p11.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/121107-p11.pdf). Aufgerufen am: 15.02.2018.
  - [6] N. Koshy *World Population Prospects United Nations*, abrufbar unter: [www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjhyqqTnqjZAhVDJcAKHSwgCq8QFggrMAA&url=https%3A%2F%2Fesa.un.org%2Fpubs%2Fpublications%2Ffiles%2FWPP2017\\_KeyFindings.pdf&usq=AOvVaw0JVwNYwYpVvUoW9s1soLjt](http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjhyqqTnqjZAhVDJcAKHSwgCq8QFggrMAA&url=https%3A%2F%2Fesa.un.org%2Fpubs%2Fpublications%2Ffiles%2FWPP2017_KeyFindings.pdf&usq=AOvVaw0JVwNYwYpVvUoW9s1soLjt). Aufgerufen am: 15.02.2018.
  - [7] *The Future Environmental Impact from the Chemicals Industry*, abrufbar unter: [www.oecd.org/env/ehs/thefutureenvironmentalimpactfromthechemicalsindustry.htm](http://www.oecd.org/env/ehs/thefutureenvironmentalimpactfromthechemicalsindustry.htm). Aufgerufen am: 15.02.2018.
  - [8] *Chemisch-pharmazeutische Industrie belastet die Umwelt*, abrufbar unter: [www.umweltbundesamt.de/daten/chemikalien/strukturdaten-chemikalien-chemisch-pharmazeutische](http://www.umweltbundesamt.de/daten/chemikalien/strukturdaten-chemikalien-chemisch-pharmazeutische). Aufgerufen am: 06.01.2018.
  - [9] *The Millennium Project the 15 Global Challenges*, abrufbar unter: [www.millennium-project.org/projects/challenges/](http://www.millennium-project.org/projects/challenges/). Aufgerufen am: 21.02.2018.
  - [10] M. Eissen, R. Mazur, H.-G. Quebbemann, K.-H. Pennemann, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 524.
  - [11] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry. Theory and practice*, Oxford Univ. Press, Oxford, **2000**.
  - [12] R. D. Schmid, R. Hammelehle, *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
  - [13] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2011**.
  - [14] J. Magan, J. R. Dunetz, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 2177.
  - [15] C. C. C. J. Seechurn, M. O. Kitching, T. J. Colacot, V. Snieckus, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 5062.
  - [16] K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 4442.
  - [17] GESTIS-Stoffdatenbank *Palladium(II)-chlorid*, abrufbar unter: [gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/002570.xml?f=templates\\$fn=document-frameset.htm\\$q=%5Bfield,schnellsuche%3A\\*Palladium\\*%5D%20\\$x=server\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/002570.xml?f=templates$fn=document-frameset.htm$q=%5Bfield,schnellsuche%3A*Palladium*%5D%20$x=server$3.0). Aufgerufen am: 22.08.2018.
  - [18] GESTIS-Stoffdatenbank *Osmium(VIII)-oxid*, abrufbar unter: [gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/000000.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$vid=gestisdeu:sdbdeu\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates$fn=default.htm$vid=gestisdeu:sdbdeu$3.0). Aufgerufen am: 22.08.2018.
  - [19] *The Risk list. British Geological Survey*, abrufbar unter: [www.bgs.ac.uk/news/NEWS/Risk\\_List\\_2012\\_Press\\_Release.pdf](http://www.bgs.ac.uk/news/NEWS/Risk_List_2012_Press_Release.pdf). Aufgerufen am: 22.08.2018.
  - [20] F. D. Dick, *Occup. Environ. Med.* **2006**, 63, 221–6, 179.
  - [21] B. H. Lipshutz, S. Ghorai, *Green Chem.* **2014**, 16, 3660.
-

- [22] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, 409, 258.
  - [23] J. Hagen, *Industrial catalysis. A practical approach*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
  - [24] S. Rebsdatt, D. Mayer, "Ethylene Oxide" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2012**, pp. 548–572.
  - [25] B. Schäfer, *Naturstoffe der chemischen Industrie*, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, **2007**.
  - [26] *Synthesis of [beta]-lactam antibiotics. Chemistry, biocatalysis & process integration*. A. Bruggink (Ed.), Kluwer Academic, Dordrecht, **2001**.
  - [27] T. van der Does, E. de Vroom, J. C. Kapur, WO 98/48038 (Patent), **29.10.1998**.
  - [28] B. Schulze, M. G. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 609.
  - [29] F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, "Monooxygenase-Catalyzed Redox Cascade Biotransformations" in *Cascade Biocatalysis Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions* (Eds.: S. Riva, W.-D. Fessner), Wiley-VCH, Weinheim, **2014**, pp. 44–61.
  - [30] S. W. Smith, *Toxicol. Sci.* **2009**, 110, 4.
  - [31] A. Calcaterra, I. D'Acquarica, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 147, 323.
  - [32] J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 1443.
  - [33] R. A. Sheldon, "Enzymatic Synthesis of Sitagliptin" in *Green biocatalysis* (Ed.: R. N. Patel), Wiley-VCH, Weinheim, **2016**, pp. 11–12.
  - [34] T. Ohara, T. Sato, N. Shimizu, G. Prescher, H. Schwind, O. Weiberg, K. Marten, H. Greim, "Acrylic Acid and Derivatives" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2012**, pp. 2–17.
  - [35] H. W. Doelle, A. Fiechter, S. Lütz, G. Schlegel, S. Shimizu, K. Würges, H. Yamada, "Biocatalysis, 1. General" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2000**, pp. 462–475.
  - [36] J.-E. Jo, S. Mohan Raj, C. Rathnasingh, E. Selvakumar, W.-C. Jung, S. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 81, 51.
  - [37] H. G. O. Becker, R. Becker, G. Domschke, E. Fanghänel, W. D. Habicher, P. Metz, D. Pavel, K. Schwetlick, "Reduktion von Carbonylverbindungen durch Aluminium und Borhydride" in *Organikum* (Ed.: Schwetlick K.), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, pp. 568–569.
  - [38] M. C. Reed, A. Lieb, H. F. Nijhout, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **2010**, 32, 422.
  - [39] J. E. Přenosil, Ö. M. Kut, I. J. Dunn, E. Heinzle, "Biocatalysis, 2. Immobilized Biocatalysts" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2012**, pp. 478–527.
  - [40] Christoph Syldatk, Bernhard Hauer, Oliver May, *BIOspektrum* **2001**, 145.
  - [41] J. Wachtmeister, D. Rother, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, 42, 169.
  - [42] J. Sun, J. S. G. Jeffries, C. S. Henry, S. D. Bruner, A. D. Hanson, *Metab. Eng.* **2017**, 44, 150.
  - [43] F. W. Schenck, "Glucose and Glucose-Containing Syrups," in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH-Verl., Weinheim, **2012**, pp. 46–66.
  - [44] G. E. Jeromin, M. Bertau, *Bioorganikum. Praktikum der Biokatalyse*, Wiley-VCH-Verl., Weinheim, **2005**.
  - [45] P. Clapés, X. Garrabou, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2263.
  - [46] *Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum*. Schwetlick K. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
-

- [47] D. Güclü, A. Szekrenyi, X. Garrabou, M. Kickstein, S. Junker, P. Clapés, W.-D. Fessner, *ACS Catal.* **2016**, 6, 1848.
  - [48] M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 11055.
  - [49] S. M. Dean, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1308.
  - [50] A. H. Romano, T. Conway, *Res. Microbiol.* **1996**, 147, 448.
  - [51] N. J. Kruger, A. v. Schaewen, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2003**, 6, 236.
  - [52] G. Löffler, "Stoffwechsel von Glucose und Glycogen. Induktion und Repression von Enzymen der Glycolyse und Gluconeogenese" in *Biochemie und Pathobiochemie* (Eds.: G. Löffler, P. E. Petrides), Springer, Berlin, **2003**, p. 422.
  - [53] C. Kohlpaintner, M. Schulter, J. Falbe, P. Lappe, J. Weber, G. D. Frex, "Aldehydes, Aliphatic" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Elvers B.), Wiley-VCH-Verl., Weinheim u.a., **2013**, pp. 2–29.
  - [54] J. Kubitschke, H. Lange, H. Strutz, "Carboxylic Acids, Aliphatic" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: Wiley-VCH), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2010**, pp. 2–18.
  - [55] P. Clapes, W. D. Fessner, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *Curr Opin Chem Biol* **2010**, 14, 154.
  - [56] A. K. Samland, *BIOspektrum* **2012**, 18, 254.
  - [57] M. Schürmann, M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19-20, 247.
  - [58] A. Liljeblad, A. Kallinen, L. T. Kanerva, *Adv. Org. Synth.* **2013**, 3, 195.
  - [59] Daniel Mink *Industrial Enzymatic C-C Bond Formation*, abrufbar unter: [www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj96I6tg7\\_ZAhUG2KQKHemZDhsQFgg8MAI&url=https%3A%2F%2Fwww.dsm.com%2Fcontent%2Fdam%2Fdsd%2Fworld%2Fen\\_US%2Fdocuments%2F2015-09-16-science-industrial-enzymatic-c-c-bond-formation.pdf&usq=AOvVaw2ppeeYbtu0IO4U66QC9g7](http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj96I6tg7_ZAhUG2KQKHemZDhsQFgg8MAI&url=https%3A%2F%2Fwww.dsm.com%2Fcontent%2Fdam%2Fdsd%2Fworld%2Fen_US%2Fdocuments%2F2015-09-16-science-industrial-enzymatic-c-c-bond-formation.pdf&usq=AOvVaw2ppeeYbtu0IO4U66QC9g7). Aufgerufen am: 24.02.2018.
  - [60] M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J. Biol. Chem.* **2000**, 276, 11055.
  - [61] E. Fjaervik, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 67, 436.
  - [62] M. Rale, S. Schneider, G. A. Sprenger, A. K. Samland, W.-D. Fessner, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 2623.
  - [63] C. Guerard-Helaine, V. de Berardinis, M. Besnard-Gonnet, E. Darii, M. Debacker, A. Debar, C. Fernandes, V. Helaine, A. Mariage, V. Pellouin et al., *ChemCatChem* **2015**, 7, 1871.
  - [64] J. Fanton, F. Camps, J. A. Castillo, C. Guerard-Helaine, M. Lemaire, F. Charmantray, L. Hecquet, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 203.
  - [65] X. Garrabou, J. A. Castillo, C. Guerard-Helaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire, P. Clapes, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 5521.
  - [66] A. L. Concia, C. Lozano, J. A. Castillo, T. Parella, J. Joglar, P. Clapes, *Chem. - Eur. J.* **2009**, 15, 3808.
  - [67] X. Yang, L. Ye, A. Li, C. Yang, H. Yu, J. Gu, F. Guo, L. Jiang, F. Wang, H. Yu, *Catal. Sci. Technol.* **2017**, 7, 382.
  - [68] M. Mifsud, A. Szekrenyi, J. Joglar, P. Clapes, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, 84, 102.
  - [69] J. A. Castillo, J. Calveras, J. Casas, M. Mitjans, M. P. Vinardell, T. Parella, T. Inoue, G. A. Sprenger, J. Joglar, P. Clapes, *Org. Lett.* **2006**, 8, 6067.
  - [70] A. K. Samland, M. Rale, G. A. Sprenger, W.-D. Fessner, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1454.
  - [71] M. Schuermann, D. Mink, D. J. Hyett, 703344(Patent).
  - [72] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4192.
-

- [73] S. Becker, H. Höbenreich, A. Vogel, J. Knorr, S. Wilhelm, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, M. T. Reetz, H. Kolmar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5085.
  - [74] S. Thorell, M. Schürmann, G. A. Sprenger, G. Schneider, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 161.
  - [75] *Erstellt mit: The PyMOL Molecular Graphics System Version 1.3*, Schrödinger, LLC.
  - [76] A. Soler, M. L. Gutierrez, J. Bujons, T. Parella, C. Minguillon, J. Joglar, P. Clapes, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1787.
  - [77] R. Roldan, I. Sanchez-Moreno, T. Scheidt, V. Helaine, M. Lemaire, T. Parella, P. Clapes, W.-D. Fessner, C. Guerard-Helaine, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 5005.
  - [78] J. A. Castillo, C. Guerard-Helaine, M. Gutierrez, X. Garrabou, M. Sancelme, M. Schuermann, T. Inoue, V. Helaine, F. Charmantray, T. Gefflaut et al., *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1039.
  - [79] a) A. Szekrenyi, A. Soler, X. Garrabou, C. Guerard-Helaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire, J. Bujons, P. Clapes, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 12572; b) A. Szekrenyi, X. Garrabou, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapes, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 724.
  - [80] M. Gutierrez, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapes, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5762.
  - [81] J. Wang, R. Tong, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1936.
  - [82] P. M. Vadhadiya, J. K. Rout, C. V. Ramana, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 9088.
  - [83] I. H. Hwang, D. C. Swenson, J. B. Gloer, D. T. Wicklow, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 523.
  - [84] A. Pagliarani, S. Nesci, V. Ventrella, *Mitochondrion* **2013**, *13*, 312.
  - [85] S. Jennewein, M. Schurmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537.
  - [86] K. Konno, M. Miura, M. Toriyama, S. Motohashi, R. Sawamura, W. Watanabe, H. Yoshida, M. Kato, R. Yamamoto, K. Yasukawa et al., *J. Nat. Med.* **2013**, *67*, 773.
  - [87] G. Klebe, *Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2006**.
  - [88] S. Thorell, M. Schürmann, G. A. Sprenger, G. Schneider, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 161.
  - [89] A. Lehwiss-Litzmann, P. Neumann, C. Parthier, S. Ludtke, R. Golbik, R. Ficner, K. Tittmann, *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 678.
  - [90] K. Miyazaki, F. H. Arnold, *J. Mol. Evol.* **1999**, 716.
  - [91] A. E. Firth, W. M. Patrick, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W281-W285.
  - [92] A. Lützen, V. Lander, "D-Fructose" in *Römpp Enzyklopädie Online* (Ed.: Thieme Verl.), Thieme Verl., Stuttgart, **2007**, <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-06-01992>.
  - [93] H. Bisswanger, *Practical enzymology*, Wiley-Blackwell, Weinheim, **2012**.
  - [94] *Das fsa D6E-Plasmid wurde freundlicherweise von Clapés et al. zur Verfügung gestellt.*
  - [95] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *3*.
  - [96] K. Tanaka, K. Fukase, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 983.
  - [97] Z. G. Hajos, D. R. Parrish, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1615.
  - [98] C. F. Barbas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 42.
  - [99] A. Szekrenyi, *Dissertation*, Universität Barcelona, Barcelona, **2014**.
  - [100] R. August, I. McEwen, R. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1987**, 1683.
  - [101] S. Schneider, T. Sandalova, G. Schneider, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30064.
  - [102] F. Kaplan, P. Setlow, N. O. Kaplan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *132*, 91.
  - [103] K.-C. Tsou, C.-S. Cheng, M. M. Nachlas, A. M. Seligman, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 6139.
  - [104] V. Jain, D. Thielen, *J. Chromatogr. A* **1995**, *709*, 387.
  - [105] J.-P. Dufour, M. Leus, A. J. Baxter, A. R. Hayman, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2018**, *57*, 138.
-

- [106] S. N. Rampersad, *Sensors* **2012**, *12*, 12347.
  - [107] I. Zwolak, *Toxicol. Ind. Health* **2016**, *32*, 1013.
  - [108] P. Catomeris, R. J. Thibert, *Microchem. J.* **1988**, 390.
  - [109] S. Chakraborty, S. Ganguli, A. Chowdhury, M. Ibba, R. Banerjee, *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, *1862*, 1801.
  - [110] G. Salinas, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 2650.
  - [111] N. He, D. Yi, W.-D. Fessner, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2384.
  - [112] R. I. Lindstad, P. Köll, S. McKinley-McKee, *Biochem. J.* **1998**, 479.
  - [113] B. Weber, *Koordinationschemie. Grundlagen und aktuelle Trends*, Springer Spektrum, Berlin, **2014**.
  - [114] C. J. Ward, P. Patel, T. D. James, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 462.
  - [115] H. Jochens, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1861.
  - [116] H.J. Joosten *Webseite der Software bio-product*, abrufbar unter: [www.bio-product.nl/](http://www.bio-product.nl/). Aufgerufen am: 01.07.2018.
  - [117] C. Miller, *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual. Revision F.0*, **2015**.
  - [118] *Das Material wurde freundlicherweise von Frau Yenchi Thai zu Verfügung gestellt, die Herstellung erfolgte mittels DERA aus Propanal.*
  - [119] U. Schörken, S. Thorell, M. Schürmann, J. Jia, G. A. Sprenger, G. Schneider, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 2408.
  - [120] *Bildvorlage der Codonsonne*, abrufbar unter: [www.abiweb.de/assets/courses/img/original-abituraufgabe-biologie-neurobiologie-zytologie-evolution-oekologie/Screen\\_shot\\_2013-01-13\\_at\\_09.11.38.png%20%20%20aufgerufen%20am%2015.02.2018](http://www.abiweb.de/assets/courses/img/original-abituraufgabe-biologie-neurobiologie-zytologie-evolution-oekologie/Screen_shot_2013-01-13_at_09.11.38.png%20%20%20aufgerufen%20am%2015.02.2018). Aufgerufen am: 22.08.2018.
  - [121] W. A. Duetz, L. Ruedi, R. Hermann, K. O'Connor, J. Buchs, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2641.
  - [122] *Enzyscreen Hydrodynamics*, abrufbar unter: [www.enzyscreen.com/oxygen\\_transfer\\_rates.htm](http://www.enzyscreen.com/oxygen_transfer_rates.htm). Aufgerufen am: 23.02.2018.
  - [123] *TLC Stains*, abrufbar unter: [www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwiYjtfw1szcAhUwMwKHbxtBoAQFjAAegQIAxAC&url=http%3A%2F%2Fpcwww.liv.ac.uk%2F~jxiao%2Ftlc%2520stain.pdf&usg=AOvVaw1xqrcXT9HNRTiD7KrVunV3](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwiYjtfw1szcAhUwMwKHbxtBoAQFjAAegQIAxAC&url=http%3A%2F%2Fpcwww.liv.ac.uk%2F~jxiao%2Ftlc%2520stain.pdf&usg=AOvVaw1xqrcXT9HNRTiD7KrVunV3). Aufgerufen am: 01.08.2018.
  - [124] Westermann B., "Aldol. (3-Hydroxybutanal)" in *Römpp Enzyklopädie Online* (Ed.: Thieme Verl.), Thieme Verl., Stuttgart, **2007**, <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-01-01351>.
  - [125] L. Chen, D. P. Dumas, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 741.
  - [126] S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537.
  - [127] D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 2309.
  - [128] *Diese Mutante wurde von der Arbeitsgruppe von Pere Clapés dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.*
  - [129] R. Brückner, H.-D. Beckhaus, S. Braukmüller, J. Dirksen, D. Goepfel, M. Oestreich, *Organisch-chemisches Grundpraktikum. Grundlegende Synthesetechniken in der Themenfolge des Lehrbuchs "Reaktionsmechanismen - organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden"*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2008**.
  - [130] D. B. G. Williams, A. Cullen, A. Fourie, H. Henning, M. Lawton, W. Mommsen, P. Nangu, J. Parker, A. Renison, *Green Chem.* **2010**, *12*, 1919.
-

- [131] J. Lehmann, *J. Theor. Biol.* **2000**, 202, 129.
  - [132] N. J. Darby, T. E. Creighton, *Protein Structure*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
  - [133] M. Hackh, M. Muller, S. Ludeke, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 8922.
  - [134] *Kinetics of Sodium Borohydride Hydrolysis in Aqueous-Basic Solutions*. R. Retnamma, C. M. Rangel, A. Q. Novais, Matthews M. A. (Eds.), **2013**.
  - [135] C.-H. Wong, E. Garcia-Junceda, L. Chen, O. Blanco, H. J. M. Gijzen, D. H. Steensma, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3333.
  - [136] H. J. M. Gijzen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7585.
  - [137] Sebastian Junker, *Durchgeföhrt von Frau Dr. Anna Szekrenyi und Frau Dr. Deniz Güclü*.
  - [138] D. Güclü, M. Rale, W.-D. Fessner, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015, 2960.
  - [139] Sebastian Junker, *Wurde freundlicherweise von Frau Dr. Deniz Güclü zur Verfügung gestellt*.
  - [140] U. B. Ericsson, B. M. Hallberg, G. T. Detitta, N. Dekker, P. Nordlund, *Anal. Biochem.* **2006**, 357, 289.
  - [141] F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nature protocols* **2007**, 2, 2212.
  - [142] Sebastian Junker, *Durchgeföhrt von Frau Dr. Deniz Güclü*.
  - [143] F. W. Studier, *Protein Expression Purif.* **2005**, 41, 207.
  - [144] Bio rad *Bradford Bio rad protokoll - Google-Suche*, abrufbar unter:  
[www.google.com/search?client=firefox-b&ei=MaBUW-yNMcXXwAL2uq74BA&q=Bradford+Bio+rad+protokoll&oq=Bradford+Bio+rad+protokoll&gs\\_l=psy-ab.3.35i39k1j0i13i30k1j0i8i13i10i30k1j0i8i13i30k113.270480.271845.0.272012.7.7.0.0.0.0.122.661.4j3.7.0...0...1c.1.64.psy-ab.0.3.328...0i7i30k1.0.06N3V0QEke4](http://www.google.com/search?client=firefox-b&ei=MaBUW-yNMcXXwAL2uq74BA&q=Bradford+Bio+rad+protokoll&oq=Bradford+Bio+rad+protokoll&gs_l=psy-ab.3.35i39k1j0i13i30k1j0i8i13i10i30k1j0i8i13i30k113.270480.271845.0.272012.7.7.0.0.0.0.122.661.4j3.7.0...0...1c.1.64.psy-ab.0.3.328...0i7i30k1.0.06N3V0QEke4). Aufgerufen am: 22.07.2018.
  - [145] *QuikChange Primer Design*, abrufbar unter:  
[www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&\\_requestid=303057](http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&_requestid=303057). Aufgerufen am: 31.03.2018.
  - [146] *Chromas*, abrufbar unter: [technelysium.com.au/wp/%20chromas/](http://technelysium.com.au/wp/%20chromas/). Aufgerufen am: 31.03.2018.
  - [147] M. Wayne Davis *ApE A plasmid Editor*, abrufbar unter:  
[biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/](http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/). Aufgerufen am: 15.02.2018.
  - [148] Mario Lange *Tipp 182: Agarplatten im Schnelldurchlauf*, abrufbar unter:  
[www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick182.lasso](http://www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick182.lasso). Aufgerufen am: 31.03.2018.
  - [149] D. Hanahan, *Journal of Molecular Biology* **1983**, 166, 557.
  - [150] *paint.net*, abrufbar unter: [www.getpaint.net/index.html](http://www.getpaint.net/index.html). Aufgerufen am: 15.02.2018.
  - [151] B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2395.
  - [152] *pET-16b DNA - Novagen | 69662*, abrufbar unter:  
[www.merckmillipore.com/DE/de/product/pET-16b-DNA-Novagen,EMD\\_BIO-69662](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/pET-16b-DNA-Novagen,EMD_BIO-69662). Aufgerufen am: 21.02.2018.
  - [153] QIAGEN *pQE-40 (map) - QIAGEN*, abrufbar unter:  
[www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=e8f50652-4da9-42bd-93d0-e60edc0469bd&lang=en](http://www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=e8f50652-4da9-42bd-93d0-e60edc0469bd&lang=en). Aufgerufen am: 21.02.2018.
-

---

# Lebenslauf und Bildungsweg

---

Sebastian Junker  
Diplom-Biochemiker



## Berufliche Erfahrungen

09/2017 - heute    **Pharmaberater bei IQVIA** während meiner Promotion

10/2010 - 10/2016    **TU Darmstadt | Institut für Organische Chemie und Biochemie**  
**Wissenschaftlicher Mitarbeiter**

- Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Wolf-Dieter Fessner im Gebiet der angewandten Enzymkatalyse und des *Protein Engineerings* von C-C Verknüpfenden Enzymen
- Promotion zum Thema „Entwicklung neuartiger Aldolasevarianten für nicht hydroxylierte Donorsubstrate mittels gelenkter Evolution“

## Ausbildung

10/2010 – 08/2018    **Promotion | Institut für Organische Chemie und Biochemie | TU Darmstadt**  
Dissertation: „*Entwicklung neuartiger Aldolasevarianten für nicht hydroxylierte Donorsubstrate mittels gelenkter Evolution*“

### Auslandserfahrung:

*Short-Term-Scientific-Mission | European Cooperation in Science and Technology* Programmes  
*Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, Barcelona (ES) | 12/2011 (25 Tage)*

- Untersuchung von relativen Kinetiken neuer Fructose-6-phosphat Aldolase Varianten mit neuartigen Substraten im Labor von Prof. Dr. Pere Clapés

*Short-Term-Scientific-Mission | European Cooperation in Science and Technology* Programmes  
*Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, Barcelona (ES) | 03/2011 (18 Tage)*

- Untersuchung der Lösungsmitteltoleranz der Fructose-6-phosphat-Aldolase im Labor von Prof. Dr. Pere Clapés

10/2004 - 02/2010    **Diplom-Biochemiker | Ernst-Moritz-Arndt Universität zu Greifswald**  
Schwerpunkte: Bioorganische Chemie und Molekularbiologie  
Diplomarbeit: „*Darstellung eines photoaktiven Phosphoramidites zur Verwendung für die automatisierten RNA-Synthese*“

---

- 04/2009 - 02/2010 **Auslandserfahrung:**  
Praktischer Teil der Diplomarbeit | Queen's University Belfast/Nordirland |  
Im Labor von Dr. Joe Vyle
- 07/2009 - 10/2009 **Vollzeitstipendium des DAAD** zur Anfertigung der Diplomarbeit in Belfast |
- 06/2004 Allgemeine Hochschulreife | Dreilinden-Gymnasium | Berlin

## Zusatzqualifikationen

Weiterbildungen Personenzertifizierter **Qualitätsmanager und Qualitätsbeauftragter** (TÜV)  
EDV-Kenntnisse Microsoft Office | SciFinder, PyMOL, 3DM, YASARA, MestreNova, ChemDraw, VBA  
Sprachkenntnisse **Deutsch:** Muttersprache  
**Englisch:** Fließend in Wort & Schrift  
**Französisch:** Erweiterte Grundkenntnisse

## Weitere Angaben

Publikationen: **Sebastian Junker**, Raquel Roldan, Henk-Jan Joosten, Pere Clapés, Wolf-Dieter Fessner  
"Complete switch of reaction specificity of an aldolase by directed evolution in vitro.  
Synthesis of generic aliphatic aldol products" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 10153–  
10157, DOI: 10.1002/anie.201804831

Thangavelu Saravanan, **Sebastian Junker**, Michael Kickstein, Sascha Hein, Marie-Kristin Link,  
Jan Ranglack, Samantha Witt, Marion Lorillière, Laurence Hecquet, Wolf-Dieter Fessner  
„Donor promiscuity of a thermostable transketolase engineered by directed evolution —  
Efficient complementation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase activity" *Angew.  
Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 5358–5362, DOI: 10.1002/anie.201701169

Deniz Güclü, Anna Szekrenyi, Xavier Garrabou, Michael Kickstein, **Sebastian Junker**, Pere  
Clapés and Wolf-Dieter Fessner »Minimalist protein engineering of an aldolase provokes  
unprecedented substrate promiscuity« *ACS Catal.*, **2016**, 6(3), 1848–1852, DOI:  
10.1021/acscatal.5b02805

*Sebastian Junker*

Darmstadt, 30. August 2018